

PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA E POLI(ÁLCOOL  
VINÍLICO) / COLÁGENO TIPO I POR ELETROFIAÇÃO COAXIAL PARA  
REGENERAÇÃO DE PELE

Javier Mauricio Anaya Mancipe

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré  
Marcos Lopes Dias

Rio de Janeiro  
Setembro de 2018

PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA E POLI(ÁLCOOL  
VINÍLICO) / COLÁGENO TIPO I POR ELETROFIAÇÃO COAXIAL PARA  
REGENERAÇÃO DE PELE

Javier Mauricio Anaya Mancipe

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO  
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

---

Prof.<sup>a</sup> Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc

---

Prof. Marcos Lopes Dias, D.Sc

---

Flavia Fernandes Ferreira da Silva, D.Sc

---

Prof.<sup>a</sup> Renata Antoun Simão, D.Sc

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL  
SETEMBRO DE 2018

Mancipe, Javier Mauricio Anaya

Produção de nanofibras de policaprolactona e poli(álcool vinílico) /colágeno tipo I por eletrofiação coaxial para regeneração de pele/ Javier Mauricio Anaya Mancipe. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XIII, 101 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marcos Lopes Dias

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 88 – 97.

1. Eletrofiação coaxial. 2. Nanofibras. 3. Curativos. 4. PCL. 5. PVA/Colágeno I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e a oportunidade de uma nova experiência que me fizeram crescer na vida pessoal e profissional.

Também gostaria de agradecer a minha família pelo apoio, a meus pais José e Gloria, meu irmão Andrés pela força, pelos conselhos que serviram como suporte para me esforçar e ser sempre melhor. A minha irmã Elizabeth pelos conselhos e pelo exemplo sempre a seguir. Pela sua ajuda que sem a qual não teria sido possível esta experiência maravilhosa a quem dedico esta dissertação.

Aos meus orientadores pelo apoio e tudo o suporte para o desenvolvimento desta dissertação. À professora Rossana Thiré por ter me aceito para fazer parte deste maravilhoso grupo de pesquisa de Biopolímeros, pelo voto de confiança e ter apostado em mim. Sempre estarei imensamente grato. Ao professor Marcos Dias pela orientação e ajuda no desenvolvimento desta dissertação. Toda a experiência e os conhecimentos adquiridos nesta trajetória foram válidos e agregadores.

Aos amigos que fiz no laboratório que me acolheram e fizeram me sentir como em casa, obrigado por todas as trocas acadêmicas e de vida que tivemos ao longo desses anos juntos. Aprendi muito com cada um de vocês: Marcell, Paulo Henrique, Marianna, Bruna, Aline, Taís, Flavia, Jean, Dahyna, e Arthur, obrigado pelas ajudas e a paciência para me ensinar, apesar da língua sempre estiveram disponíveis para me explicar cada termo desconhecido para mim.

Agradeço aos meus amigos da sala da pós-graduação, Leilane, Thays, Jeniffer, Bianca, Emanuel, Geilza, Guilherme entre tantos que me ajudaram neste trajeto, pelos bate papos realizados, as trocas de ideias, os conselhos que fizeram a minha estadia no mestrado mais ameno.

Gostaria de agradecer aos meus amigos da república: Ana Barbara, Caetano, Gabi e Rafael que mais que meus amigos foram meus irmãos no Brasil. Obrigado pela acolhida e me fazer sentir como na minha casa, sempre serão meus irmãos no Brasil.

Agradeço também ao pessoal do laboratório do IMA: Ana Toledo, Maria Clara, Ivy, Lys pela ajuda durante a minha estadia no laboratório, em especial quero agradecer a Angela a minha colega colombiana pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório muito obrigado.

E a todos que de diferentes maneiras aportaram para a realização desta dissertação, muito obrigado.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA E POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) / COLÁGENO TIPO I POR ELETROFIAÇÃO COAXIAL PARA REGENERAÇÃO DE PELE

Javier Mauricio Anaya Mancipe

Setembro/2018

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marcos Lopes Dias

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver filmes nano estruturados compostos por fibras coaxiais de colágeno tipo I / poli(álcool vinílico) (casca) e policaprolactona (PCL) no núcleo, utilizando a técnica de eletrofiação, visando sua aplicação para regeneração da pele. Inicialmente, foi analisada a influência do sistema de solventes, vazão, voltagem e distância percorrida na morfologia de fibras monolíticas de PCL e da mistura Col\_1/PVA eletrofiadas separadamente. Em seguida, as melhores condições foram avaliadas para formação de nanofibras coaxiais, tendo PCL no núcleo e Col\_1/PVA na casaca. Nanofibras núcleo – casca com diâmetro médio de 346 nm foram obtidas com relação de vazão de Col\_1/PVA:PCL, de 1:4, distância percorrida de 12 cm e voltagem de 16 kV. Nestas condições, a estrutura em tripla hélice característica da molécula de colágeno foi mantida. O filme nanoestruturado apresentou capacidade de intumescimento, liberação de colágeno, morfologia e não citotoxicidade adequados para aplicação na regeneração tecidual, sendo um curativo potencial para lesão de pele.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

PRODUCTION OF POLYCAPROLACTONE AND POLYVINIL ALCOHOL /  
COLLAGEN TYPE I NANOFIBERS BY CO-AXIAL ELECTROSPINNING FOR  
SKIN REGENERATION

Javier Mauricio Anaya Mancipe

September/2018

Advisors: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marcos Lopes Dias

Department: Metallurgical and Material Engineering

The main goal of this work was to develop nano-structured films composed of coaxial fibers of collagen type I / polyvinyl alcohol (shell) and polycaprolactone (PCL) in the core, using the electrospinning technique, aiming its application for skin regeneration. Initially, the influence of solvent system, flow, voltage and distance traveled on the morphology of PCL and Col\_1 / PVA mixture monolithic fibers electrospun separately were analyzed. The best conditions for the formation of coaxial nanofibers, having PCL in the core and Col\_1 / PVA in the shell were evaluated. Nanofibers core - shell with mean diameter of 346 nm were obtained with Col\_1 / PVA:PCL flow ratio of 1:4, distance needle to collector of 12 cm and voltage of 16 kV. Following these conditions, the characteristic triple helical structure of the collagen molecule was maintained. The nanostructured film showed swelling capacity, collagen release, morphology and non-cytotoxicity suitable for application in tissue regeneration, being a potential dressing for skin lesion.

# SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO II.....	3
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
CAPÍTULO III .....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Biologia da ferida.....	4
3.2 Processo de cicatrização da pele .....	4
3.3 Engenharia Tecidual .....	7
3.4 Características gerais da pele .....	8
3.4.1 Estrutura e característica dos arcabouços para regeneração de pele .....	10
3.5 Eletrofiação (electrospinning).....	10
3.5.1 Parâmetros referentes à solução .....	13
3.5.2 Condições do processamento.....	16
3.5.3 Parâmetros referentes ao ambiente .....	18
3.6 Eletrofiação coaxial .....	18
3.7 Biomateriais para regeneração de pele .....	21
3.7.1 Colágeno tipo I .....	22
3.7.2 Policaprolactona (PCL) .....	24
3.8 Filmes de colágeno/PCL produzidos por eletrofiação .....	26
CAPÍTULO IV .....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1 Materiais .....	28
4.2 Metodologia .....	28

4.3	Preparo das soluções.....	29
4.3.1	Solubilização do PCL.....	30
4.3.2	Solubilização do PVA/Colágeno I.....	31
4.4	Processo de eletrofiação monolítica.....	31
4.4.1	Eletrofiação do PCL.....	32
4.4.2	Eletrofiação do PVA/Colágeno I.....	33
4.5	Processo de eletrofiação coaxial.....	33
4.6	Técnicas de caracterização.....	34
4.6.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
4.6.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	34
4.6.3	Microscopia de Fluorescência.....	34
4.6.4	Análise termogravimétrica (TGA).....	34
4.6.5	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	35
4.6.6	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	35
4.6.7	Análise de ângulo de contato.....	36
4.6.8	Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	36
4.6.9	Viscosimetria.....	36
4.6.10	Condutividade Elétrica.....	36
4.6.11	Ensaio de degradação <i>in vitro</i> do filme coaxial.....	37
4.6.12	Grau de intumescimento.....	37
4.6.13	Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade.....	38
CAPÍTULO V.....		39
5	ANÁLISE DE RESULTADOS.....	39
5.1	Eletrofiação monolítica de PCL.....	39
5.1.1	Influência da vazão na eletrofiação do PCL.....	45
5.1.2	Efeito do solvente no processo de eletrofiação de PCL.....	46
5.1.3	Avaliação da massa molar do PCL eletrofiado.....	47



5.1.4	Comportamento térmico dos filmes .....	48
5.1.5	Análise estrutural dos filmes de PCL .....	49
5.1.6	Transições térmicas e cristalinidade das fibras de PCL .....	51
5.2	Eletrofiação monolítica de Colágeno I/PVA .....	54
5.2.1	Avaliação na formulação da solução Col_1/PVA. ....	55
5.2.2	Avaliação morfológica das fibras de Col_1/PVA. ....	57
5.2.3	Análise estrutural das fibras eletrofiadas de Col_1/PVA. ....	59
5.2.4	Análise térmica das fibras.....	62
5.3	Eletrofiação de fibras núcleo–casca de PCL – Col_1/PVA.....	64
5.3.1	Influência da Vazão nas fibras núcleo – casca. ....	65
5.3.2	Influência da voltagem nas fibras.....	68
5.3.3	Influência da distância percorrida.....	70
5.3.4	Microscopia de fluorescência .....	72
5.3.5	Molhabilidade dos filmes .....	73
5.3.6	Microscopia eletrônica de transmissão.....	74
5.3.7	Avaliação da superfície das fibras núcleo -casca. ....	77
5.3.8	Ensaio de Intumescimento dos filmes .....	78
5.3.9	Ensaio de degradação do Colágeno. ....	81
5.3.10	Análise de citotoxicidade.....	82
CAPITULO VI .....		85
6	Conclusões .....	85
CAPITULO VII.....		87
7	Sugestões para trabalhos futuros .....	87
CAPÍTULO VIII .....		88
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
CAPÍTULO IX .....		98
9	ANEXOS: HISTOGRAMAS.....	98

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação gráfica do processo natural de cicatrização de uma ferida cutânea .....	5
<b>Figura 2.</b> Terminais sensoriais da pele .....	9
<b>Figura 3.</b> Aplicações usadas nas membranas produzidas por eletrofiação.....	11
<b>Figura 4.</b> Representação do sistema horizontal de eletrofiação .....	12
<b>Figura 5.</b> Morfologia das estruturas obtidas por eletrofiação. A) formação de contras ( <i>beads</i> ). B) combinação de contas e fibras. C) fibras contínuas.....	14
<b>Figura 6.</b> Representação gráfica da influência da voltagem nas fibras .....	16
<b>Figura 7.</b> Representação de eletrofiação coaxial .....	18
<b>Figura 8.</b> Publicações registradas para os termos <i>electrospinning</i> e coaxial.....	19
<b>Figura 9.</b> Distribuição das cargas elétricas na formação do jato núcleo – casca.....	20
<b>Figura 10.</b> Razão da vazão da solução que forma o núcleo em relação à solução que forma a casca .....	20
Figura 11. Representação da estrutura do Colágeno tipo I.....	23
<b>Figura 12.</b> Esquema simplificado da metodologia e caracterizações. ....	29
<b>Figura 13.</b> Sistema de eletrofiação do LCPRB do IMA-UFRJ .....	32
<b>Figura 14.</b> Dispositivo usado na formação da fibra coaxial, com as partes que a compõem. 1) Solução de Col_1/PVA; 2) Solução de PCL .....	33
<b>Figura 15.</b> Influência da concentração de PCL na morfologia. Voltagem de 10 kV. {A) 5%, B) 8%, C)10% }. Para voltagem de 12,5 kV. {D) 5%, E) 8%, F) 10% }. ....	40
<b>Figura 16.</b> Relação dos parâmetros Vs diâmetro das fibras para uma solução de PCL 10 % em P/V.....	41
<b>Figura 17.</b> Imagem de MEV (x10.0 kx) para as fibras eletrofiadas de PCL10_90AC/AF com varrições na Vazão (0,5 ml/h; 0,75 mL/h) e na voltagem aplicada (12,5 kV; 17 kV). ....	42
<b>Figura 18.</b> Imagens de MEV mostrando a influência da voltagem em função do solvente na morfologia das fibras de PCL.....	44
<b>Figura 19.</b> Imagens de MEV mostrando a influência da vazão na morfologia das fibras de PCL eletrofiadas segundo o sistema de solvente. Voltagem: 17 kV, distância percorrida: 15 cm e concentração: 10% (p/v).....	45
<b>Figura 20.</b> Curvas de TGA de PCL e de filmes eletrofiados de PCL.....	48

<b>Figura 21.</b> Espectros de FTIR-ATR para PCL e fibras eletrofiadas a partir dos diferentes sistemas solvente.....	49
<b>Figura 22.</b> Comparativo da cristalinidade por FTIR – ATR para o PCL. A) banda na fase cristalina, B) banda na fase amorfa. ....	50
<b>Figura 23.</b> Curvas de DSC do primeiro ciclo de aquecimento a 10°C/min para o PCL 10% p/v, para cada um dos sistemas solvente. ....	52
<b>Figura 24.</b> Curvas de DSC do ciclo de resfriamento para o PCL usando taxa de 10°C/min, para cada um dos sistemas solvente. ....	52
<b>Figura 25.</b> Curvas de DSC (segundo aquecimento) para o PCL para os filmes de PCL obtidos a partir de cada um dos sistemas solvente. ....	53
<b>Figura 26.</b> Imagens da solução de colágeno tipo I em AC glacial e água ultrapura (AQ) com relação volumétrica. A) solução após da solubilização. B) Solução de 75Col_1/PVA após de 12 horas em repouso a 4°C.....	56
<b>Figura 27.</b> Imagens de MEV das fibras eletrofiadas das soluções de 4% de Colágeno com variação da concentração de PVA com voltagem fixa de 17 kV e com variação da vazão: 0,2 ml/h; 0,3 ml/h e 0,5 ml/h.....	58
<b>Figura 28.</b> Espectros de FTIR-ATR comparativo para as fibras eletrofiadas de PVA-Col_1, colágeno tipo I e pellets de PVA na faixa entre 4000 e 500 cm <sup>-1</sup> .....	60
<b>Figura 29.</b> Região de 1000 a 1600 cm <sup>-1</sup> dos espectros de FTIR -ATR comparativo para a banda de 1548 referente à estrutura helicoidal do colágeno I e após da eletrofiação..	61
<b>Figura 30.</b> Curvas de DSC do primeiro aquecimento na faixa de 0°C -250°C com fluxo de calor de 10°C/min. Avaliação térmica por DSC para as fibras de 4%PVA/Col, o Colágeno I e a PVA. ....	63
<b>Figura 31.</b> Curvas de DSC do Segundo aquecimento para as fibras de 4% Col_1/PVA, PVA e colágeno I, na faixa de 0°C até 200°C.....	63
<b>Figura 32.</b> Imagens de MEV mostrando a influência da vazão da casca na morfológica do sistema coaxial de Col_1/PVA – PCL, usando 17 kV e 10 cm de distância percorrida. A) vazão casca: 0,3 ml/h. B) vazão casca: 0,2 ml/h.....	66
<b>Figura 33.</b> Imagens de MEV das fibras núcleo – casca com variação na vazão do núcleo (PCL) usando 17 kV e 10 cm de distância percorrida: A) 0,05 ml/h. B) 0,06 ml/h. C) 0,07 ml/h.....	67
<b>Figura 34.</b> Imagens de MEV mostrando a influência da voltagem na morfologia das fibras núcleo – casca obtidas com o sistema de PCL-Col_1/PVA com 10 cm de distância percorrida: A) 15 kV, B) 16 kV, C) 17 kV e D) 19 kV.....	69

<b>Figura 35.</b> Imagens de MEV mostrando a influência da distância percorrida na morfologia das fibras núcleo-casca obtidas por eletrofição coaxial. A) 10 cm, B) 12 cm, C) 14 cm e D) 16 cm.....	71
<b>Figura 36.</b> Micrografias de fluorescência para: A) sistema núcleo-casca composta por PCL no núcleo e PVA/Col 1 na casca. B) fibras monolíticas de PCL. ....	73
<b>Figura 37.</b> Medida do ângulo de contato para as fibras eletrofiadas. A) Fibras de PCL, B) Fibras de PVA/COL 1, e C) fibras núcleo – casca de PCL – PVA/COL 1.....	74
<b>Figura 38.</b> Microscopia de Transmissão das fibras núcleo – casca obtidas para o sistema de PCL – Col_1/PVA .....	75
<b>Figura 39.</b> Microscopia de Transmissão das fibras núcleo – casca com variação da vazão e a voltagem. ....	76
<b>Figura 40.</b> Espectros de FTIR comparativo das fibras núcleo-casca, PVA e Colágeno I. ....	78
<b>Figura 41.</b> Relação das amostras do filme com fibras núcleo –casca usadas para liberação do colágeno. A) amostras para análise de degradação. B) Amostras após 96 h de degradação. ....	79
<b>Figura 42.</b> Grau de intumescimento dos filmes compostos por nanofibras núcleo – casca em função do tempo de imersão em soro fisiológico. ....	80
<b>Figura 43.</b> Avaliação da liberação do colágeno das fibras por eletrofição coaxial em função do tempo. ....	81
<b>Figura 44.</b> Análise de citotoxicidade DHL <i>in vitro</i> de fibras coaxiais com variação da vazão da casca. ....	83
<b>Figura 45.</b> Análise de citotoxicidade MTT <i>in vitro</i> das fibras coaxiais com variação da vazão da casca. ....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Viscosidade e tensão superficial de diferentes soluções usados na formação de fibras .....	15
<b>Tabela 2.</b> Características dos Solventes utilizados na eletrofiação.....	28
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros utilizados na eletrofiação monolítica do PCL. ....	32
<b>Tabela 4.</b> Condições iniciais de eletrofiação do PCL com 90AC/AF. ....	39
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros para eletrofiação do PCL em função do tipo de solvente .....	46
<b>Tabela 6.</b> Viscosidade e condutividade das soluções de PCL. ....	46
<b>Tabela 7.</b> $M_w$ , $M_n$ e $M_w/M_n$ do PCL medida por GPC antes (PCL) e após da eletrofiação em diferentes sistemas de solventes. ....	47
<b>Tabela 8.</b> Bandas de absorção características no infravermelho para o PCL .....	50
<b>Tabela 9.</b> Variações da cristalinidade segundo a área na banda cristalina para PCL. ...	51
<b>Tabela 10.</b> Transições térmicas referentes aos ciclos de aquecimento e resfriamento do PCL para os diferentes sistemas de solventes. ....	53
<b>Tabela 11.</b> Condições de eletrofiação utilizadas para misturas de Col_1/PVA. ....	56
<b>Tabela 12.</b> Comparação entre as bandas encontradas na amostra 4%PVC/Col_1 e as bandas características no espectro de infravermelho (FTIR-ATR) para o Colágeno tipo I (Col_1) e o poli(álcool vinílico) .....	60
<b>Tabela 13.</b> Valores usados para a obtenção de amostras núcleo – casca.....	71
<b>Tabela 14.</b> Medidas de diâmetro das fibras núcleo – casca obtidas para as condições analisadas, Vazão no núcleo: 0,05 ml/h. ....	77
<b>Tabela 15.</b> Relação de medidas das amostras núcleo-casca antes e depois da liberação do colágeno.....	79

# CAPÍTULO I

## 1 INTRODUÇÃO

Milhões de pessoas sofrem com problemas relacionados com a pele, como doenças crônicas, acidentes decorrentes de trauma, queimaduras ou defeitos entre outros. Tais lesões podem gerar feridas graves, provocando a perda das suas funções. Essa perda afeta indiretamente órgãos internos vitais, o que pode levar à morte do paciente.

A necessidade de novas alternativas para cura e/ou regenerar lesões de pele impulsionou o surgimento de novos materiais capazes de mimetizar a forma e as propriedades da matriz extracelular (MEC) nativa. Estes biomateriais podem ser utilizados em várias aplicações clínicas, dentre outros tipos de feridas.

Os polímeros sintéticos biodegradáveis tem sido uma das alternativas eficazes no desenvolvimento destes novos materiais, quais em combinação com materiais naturais (Lu et al., 2010) podem criar matrizes com capacidade de se adaptar ao tecido hospedeiro reduzindo significativamente as possibilidades de rejeição do implante.

A policaprolactona (PCL) é um dos polímeros sintéticos mais usados para criação destas matrizes, mostrando excelente capacidade para ser utilizado como carreador de fármacos. Além disso, materiais produzidos com o PCL possuem propriedades mecânicas próximas as da pele (CIPITRIA *et al.*, 2011). No entanto, por ser um polímero hidrofóbico, apresenta dificuldade de adesão com a área lesionada, além de não possuir capacidade de inchamento e consequentemente, a impossibilidade de adsorver o exsudado.

O colágeno é um polímero natural biodegradável. Por ser a proteína de maior proporção nos tecidos de mamíferos, com um teor aproximado de 70% (ZEUGOLIS *et al.*, 2008), tem sido muito utilizado na produção de materiais para engenharia tecidual. Porém, as matrizes utilizadas com colágeno puro eletrofiado apresentaram baixa resistência mecânica em comparação com a pele (POWEL e BOICE, 2009).

A eletrofiação tem sido uma das técnicas mais promissórias para fabricação de novos materiais utilizados para regeneração da pele. A conformação de filmes compostos por micro ou nanofibras depositadas aleatoriamente, tem mostrado uma proximidade importante com a MEC da pele, fazendo com que esta técnica tenha grande interesse na

engenharia tecidual. Além disso, a eletrofiação permite trabalhar com um grande número de polímeros em solução, ampliando as possibilidades da sua aplicação (LU *et al.*, 2013).

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver filmes nano estruturados compostos por fibras coaxiais de colágeno tipo I / poli(álcool vinílico) (casca) e policaprolactona (PCL) no núcleo, utilizando a técnica de eletrofiação, visando sua aplicação para regeneração da pele. Estes filmes foram caracterizados quanto a sua morfologia, composição química, propriedades térmicas, assim como ensaios *in vitro* para avaliar a degradação do colágeno e a citotoxicidade dos filmes.

# CAPÍTULO II

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

A presente dissertação teve por objetivo produzir fibras núcleo – casca compostas por policaprolactona (PCL) e poli (álcool vinílico) (PVA) /colágeno tipo I (Col 1) para sua aplicação na regeneração da pele utilizando a técnica de eletrofiação coaxial.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência dos solventes, da viscosidade e da condutividade no processo de eletrofiação monolítica de PCL;
- Obter os parâmetros para produção eficaz de nanofibras de PCL e de PVA-colágeno via eletrofiação monolítica;
- Avaliar o recobrimento das fibras com a solução de Col\_1/PVA;
- Avaliar a relação da concentração e da vazão com a espessura da camada superficial das fibras núcleo-casca, obtidas no processo de eletrofiação coaxial;
- Avaliar a degradação *in vitro* dos filmes de PCL/PVA-Col\_1 obtidos;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos filmes.



# CAPÍTULO III

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Biologia da ferida

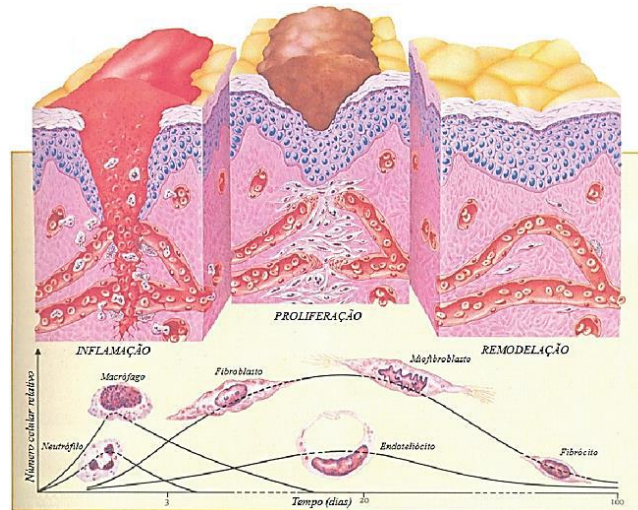
Uma ferida é uma lesão que gera perda da continuidade e na integridade dos tecidos moles como a pele, os músculos, os tendões entre outros. De forma geral as lesões são produzidas mediante a interação de um agente externo (faca, vidro, etc.). As feridas podem ser classificadas: em abertas, fechadas, simples e complexas dependendo do tamanho e da sua profundidade (SALEM *et al.*, 2000).

No momento em que é produzida uma lesão sobre o tecido tegumentar, uma série de processos biológicos e bioquímicos sucessivos são sobrepostos naturalmente e temporariamente no local, gerando a chamada “ferida cutânea” (MELKONIAN *et al.*, 2013). Este tipo de ferida pode aparecer como resposta de um trauma mecânico, procedimento cirúrgico, deficiências na circulação sanguínea, queimaduras ou envelhecimento. Com o objetivo de reparar o tecido danificado é gerado uma contusão conhecida como cicatriz. Estes processos de recuperação geram uma série de estágios ou etapas sequenciais próprios da pele que fornecem fatores que influenciam o processo de recuperação da ferida classificada em três grupos chamadas de primária, secundária e/ou terciária, que dependem do tamanho da ferida e das condições das mesmas. Diversos passos têm que ser cumpridos para que este processo seja atingido por completo entre os quais estão: a eliminação do agente gerador da lesão, irrigação, nutrição e oxigenação do tecido lesado (ELITA & BANDA, 2013).

### 3.2 Processo de cicatrização da pele

O processo de cicatrização é um mecanismo comum dado em todas as feridas ou lesões consistindo basicamente em uma série de eventos ou processos consecutivos celulares, moleculares e bioquímicos que formarão um novo tecido. Isto em resposta a uma descontinuidade gerada por fatores externos que deram passo à formação de um fenômeno irregular conhecido como cicatriz. O resultado da coordenação deste processo sequencial dos eventos espaciais e temporários forma uma contração da ferida que causa acumulação dos fibroblastos que migram até a zona lesada, ou seja, a formação da cicatriz (HARRISON & MACNEIL, 2008). Desta forma, são geradas as condições ideais para

que um tecido possa atingir seu processo de recuperação e/ou cicatrização causada pela presença destes fibroblastos como é apresentado na Figura 1. Assim, consegue-se o reparo do tecido com o alvo de estabelecer a funcionalidade total ou parcial do tecido melhorando também seu aspecto estético (ISAAC *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Representação gráfica do processo natural de cicatrização de uma ferida cutânea (ISAAC *et al.*,2010).

Embora cada tecido tenha um conjunto único de processos de cicatrização, existem três etapas comuns durante este processo uma vez que é produzida uma lesão sobre o tecido (GUARÍN *et al.*, 2013). Este processo começa imediatamente depois que a lesão tenha ocorrido dando início à fase de coagulação com um tempo de duração máxima aproximadamente de até 15 minutos o qual é sinalizado pelo recrutamento de macrófagos e outras células imunitárias (ISAAC *et al.*, 2010). Uma vez alterada a estrutura do tecido epitelial, apresenta-se a formação de um coágulo, cujo objetivo principal é deter o fluxo do sangue evitando sua perda mediante o cese da hemorragia.

O coágulo possui funções específicas como ativação celular, interação e carregamento das células que promovem a regeneração do tecido afetado, gerando as condições ótimas que promovem o início do segundo estágio da cicatrização: o processo inflamatório (VELNAR *et al.*, 2009). Uma vez gerado o coágulo é iniciado o processo de inflamação que dura aproximadamente 6 dias como resposta de proteção do tecido tentando isolar e/ou destruir os agentes de perigo que interferem na formação de um tecido novo. A presença destes agentes reduz a probabilidade da formação deste tecido pela ativação dos queratinócitos e fibroblastos, alcançando as condições necessárias para a transição entre o processo inflamatório e a etapa de reparação do tecido (WOLWACZ *et al.*, 2000).

A proliferação é uma etapa final no estágio de inflamação que se inicia no terceiro dia depois de feita a ferida, com uma duração de 15 até 20 dias (VELNAR *et al.*, 2009). O objetivo desta fase é construir uma barreira protetora com a finalidade de aumentar os processos regenerativos e evitar o ingresso de agentes nocivos que possam gerar infecções no tecido em construção. A característica principal é a migração dos fibroblastos que ajudam na formação de uma matriz extracelular (MEC) provisória, proporcionando um suporte para a contenção celular do novo tecido até conseguir a maturação da MEC (ZHANG *et al.*, 2016).

Finalmente se dá início o terceiro e último estágio do processo de cicatrização conhecido como reparação. Esta fase é de maturação ou re-epitelização envolvendo um conjunto complexo de fatores de crescimento de citosinas e moléculas de adesão celular que sinalizam células sob controle espacial conduzindo a regeneração satisfatória do tecido danificado (RICE *et al.*, 2012). A característica principal é dada pela formação, reorganização e resistência do tecido formador da síntese da MEC devida à contração da ferida gerada pelos fibroblastos e o colágeno, dando início à cicatriz na fase do crescimento com um tempo de duração prolongada em relação às anteriores.

No entanto, como foi descrito por WOLWACZ *et al.*, (2000), este processo é susceptível a interrupções por diversos fatores presentes em algum dos estágios dificultando o processo natural de recuperação e criando cicatrizes crônicas. Por outro lado, a proliferação exagerada de fibroblastos pode acarretar a formação de tecidos descontínuos conhecidas como cicatrizes queloides e/ou cicatrizes hipertróficas, desenvolvendo-se como resultado de um acúmulo excessivo de colágeno sobre a ferida. Além disso, existem diversos fatores de ordem geral que afetam o processo natural da cicatrização assim como sua constituição e funcionalidade como, por exemplo: a idade do paciente, doenças arteriais, diabetes, tabaquismo, infecções etc. (RICE *et al.*, 2012).

OSPINA *et al.*, (2014) descreveram a existência de aproximadamente 1000 doenças envolvidas à pele, citadas como exemplo: as infecções, as reações alérgicas a medicamentos e doenças como a psoríase, eczema, urticária, câncer de pele entre outras. Segundo a organização mundial da saúde (OMS), os ferimentos da pele têm requerido grandes investimentos provenientes das organizações governamentais com o objetivo de atingir a quantidade de casos presentes tentando recuperar a qualidade de vida dos pacientes.

É evidente que os processos usados em clínica para conseguir superar esta problemática têm mostrado grandes falências. Como foi citado anteriormente, a

replicação dos estágios naturais da pele pode não acontecer de forma natural fazendo com que muitas pessoas apresentem dificuldades físicas de produzir uma cicatrização de maneira natural. Alternativas têm se desenvolvido para atingir o este processo, com a ajuda de enxertos implantados em cirurgia para recobrir a ferida com substitutos de pele ajudando seu reparo usando pele natural, tais como xenoenxertos, aloenxertos e autoenxertos. No entanto, estes substitutos de pele possuem grandes limitações devido às deficiências no que diz respeito aos doadores, além do alto risco de infecções assim como uma cicatrização lenta entre outros fatores (PRICE *et al.*, 2008).

Como ajuda na melhora dos processos de cicatrização surge à necessidade de criar materiais que promovam, ajudem e busquem contornar uma via ao processo de cicatrização criando a formação de um tecido uniforme eliminando a descontinuidade criada na ferida. Como nascimento da engenharia tecidual, criou-se esta nova alternativa que relaciona os diversos materiais existentes com as ciências da saúde. Promovendo o desenvolvimento e o crescimento dos tecidos atingindo a necessidade da população mundial mediante avanços científicos.

### **3.3 Engenharia Tecidual**

A engenharia tecidual é a ciência que estuda a criação de substitutos biológicos funcionais com a capacidade de manter, restaurar ou melhorar a função de tecidos danificados ou órgãos completos (NAD: *National Institute Biomedical Imaging and Bioengineering*, 2013). Esta ciência surgiu como uma alternativa promissora para suprir a necessidade de implementar enxertos de tecidos vivos em pacientes devido ao número limitado de doadores e de possíveis rejeições por parte do tecido hospedeiro (TIMOTHY *et al.*, 2014).

Uma das estratégias da engenharia tecidual envolve a utilização de arcabouços porosos (suportes, matrizes, *scaffolds*), que podem ser combinados ou não com fatores de crescimento específicos e células. Estes arcabouços, além de serem biocompatíveis com o tecido alvo, são projetados para suprir as necessidades nutricionais e biológicas das células envolvidas na formação e/ou crescimento do novo tecido, considerando três fatores importantes: a segurança do paciente, a eficácia clínica e a conveniência de uso, com o objetivo de eliminar qualquer probabilidade de rejeição por parte do tecido receptor (HUANG *et al.*, 2015).

### 3.4 Características gerais da pele

A Sociedade Brasileira de Dermatologia define a pele como o órgão sensorial primário mais externo do corpo humano que recobre e protege os diversos órgãos e tecidos que compõem um sistema vivo, evitando que sejam expostos a fatores ambientais tais como o ar, a água, o sol etc. é um dos órgãos mais importantes do corpo humano, com uma extensão aproximada de 2 m<sup>2</sup> em um adulto comum (CLARK *et al.*, 2007).

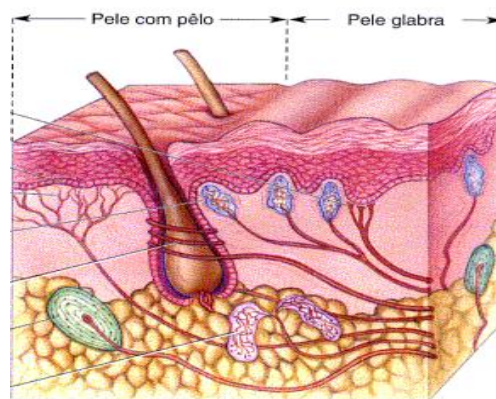
Uma pele saudável além de oferecer proteção para o funcionamento normal do organismo vivo, servindo como uma barreira protetora contra fatores externos, também oferece uma variedade de funções importantes como (GROEBER *et al.*, 2011; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013):

- Proteger o organismo de lesões, infecções, desidratação e dos raios ultravioletas;
- Perceber estímulos relacionados com o meio ambiente como: a temperatura, o tato, a pressão e a dor;
- Permitir a excreção das diversas substâncias corpóreas;
- Auxiliar o metabolismo dos lipídios por meio do tecido adiposo localizado na camada subcutânea;
- Intervir na imunologia do organismo;
- Reservatório de sangue (a derme possui extensas redes capilares que transportam de 8 – 10% do fluxo sanguíneo total de um corpo no repouso);
- Promover a síntese da vitamina D;
- É fundamental na regulação da temperatura corpórea.

A Epiderme é a camada mais externa da pele e sua principal função é formar uma barreira protetora contra os danos externos, assim como também regular a troca dos fluidos corpóreos impedindo a saída de água e a entrada de substâncias e/ou de microrganismos nocivos para corpo. É composta principalmente por queratinócitos que constroem uma barreira impermeável com espessura média de 1 mm. No entanto, esta espessura depende basicamente da localização, sendo as mais finas as presentes nas pálpebras e as mais espessas as encontradas nas mãos e solas dos pés. Também, na epiderme são encontradas as células que produzem a melanina, que é o pigmento que dá cor à pele (MACNEIL, 2007).

A derme é definida como uma camada localizada imediatamente embaixo da epiderme. Possui uma espessura aproximada na faixa de 0,5 – 5,0 mm, que também varia

dependendo da sua localização no corpo, encontrando-se as maiores espessuras na pele localizada nas costas. É formada basicamente por uma malha constituída por fibras de colágeno, elastina, reticulina, fibronectina e outros componentes coloidais, que dão a tonicidade e a elasticidade da pele (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2017). A derme possui duas subdivisões principais conhecidas como derme papilar e derme reticular. Esta camada contém uma grande quantidade de vasos sanguíneos e terminações nervosas que recebem estímulos do meio ambiente e são transmitidos ao cérebro através do sistema nervoso. Estes estímulos são traduzidos em sensações, como dor, frio, calor, pressão, vibração, cócegas, dentre outros. Além disso, na derme estão localizados os folículos pilosos e as glândulas (sebáceas e sudoríparas) responsáveis pelo suor que ajuda na troca de líquidos corpóreos e na regulação da temperatura. As diversas camadas da pele estão ilustradas na Figura 2.



**Figura 2.** Terminais sensoriais da pele. Adaptada: BEAR 2002.

A terceira e última camada da pele é conhecida como camada subcutânea ou hipoderme. O nome faz referência a sua estrutura que é constituída basicamente por células de gordura. A espessura da camada na pele varia dependendo principalmente da constituição física da pessoa, assim como do lugar da sua localização. A hipoderme é quem suporta e une as duas camadas localizadas sobre ela (a epiderme e a derme) ao resto do corpo, ajudando na regulação e/ou manutenção da temperatura corpórea e acumulando a energia necessária para o desempenho das funções biológicas (ABRAHAM, 2012).

Como a pele é um recobrimento e órgão vital do corpo, ela é mais susceptível a sofrer ferimentos provocados pela sua exposição aos múltiplos fatores do entorno, como o atrito, o calor etc., o que faz com que sofra diversas agressões, que gerarão lesões e que, por conseguinte podem originar problemas e/ou doenças.

### **3.4.1 Estrutura e característica dos arcabouços para regeneração de pele**

Pesquisas sobre regeneração da pele têm sido desenvolvidas com diversos tipos de materiais com o objetivo de obter matrizes (*scaffolds* ou arcabouços) capazes de replicar as condições e as propriedades do tecido danificado (BOCCACCINI *et al.*, 2005). Estes arcabouços são principalmente estruturas tridimensionais que mimetizam as características naturais do tecido hospedeiro servindo como suporte para a reconstrução do tecido. No entanto, para que isto aconteça, o biomaterial deve oferecer condições estruturais, biológicas e mecânicas similares com as de sua matriz extracelular nativa (MEC) (MORRIS *et al.*, 2017).

A MEC da pele possui uma estrutura complexa que dificulta a imitação exata do tecido alvo. No entanto, diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de criar materiais com a arquitetura semelhante à da MEC e taxa de degradação próxima ao tempo de crescimento do tecido danificado (CHAN & LEON, 2008).

Estes estudos também mostram a necessidade de uso de biomateriais com altos níveis de porosidade, a fim de favorecer a troca de nutrientes e a eliminação dos resíduos provenientes do processo metabólico celular etc. (MA P. X., 2008). Uma forma de mimetizar a MEC da pele é a utilização de biomateriais poliméricos nanoestruturados.

As técnicas mais usadas na obtenção destes materiais são: secagem por pulverização, separação de fases, deposição de vapor químico, nano-imprinting e o eletrofiação. A técnica de eletrofiação é a mais usada para o desenvolvimento de nano fibras contínuas e com área superficial maior que a área das estruturas fibrosas obtidas por processos convencionais de fiação (RUTLEDGE e FRIDRIKH, 2007).

### **3.5 Eletrofiação (electrospinning)**

A eletrofiação foi descrita pela primeira vez no ano de 1897 por Rayleigh. No entanto, a técnica foi patenteada por Formhals em 1934, usada para a produção de filmes ou membranas compostas por fibras finas de longo comprimento (BHARDWAJ e KUNDU, 2010). Esta característica é baseada na relação do comprimento das fibras com seu diâmetro, pelo qual são chamadas de fibras contínuas. Uma das características principais no processamento de eletrofiação é a grande área superficial das fibras produzidas (NISTA *et al.*, 2012). Segundo HUANG *et al.*, (2015), esta técnica atraiu maior interesse após da década de 80, devido ao crescente desenvolvimento dos materiais focados na área da nanotecnologia. Para esse propósito ela se encaixa perfeitamente, pois

os filmes produzidos são compostos pela adição de fibras que possuem diâmetros na escala nano ou micrométrica, motivo pelo qual são comumente denominados por filmes nano estruturados aleatório ou não tecido (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

A diferenciação significativa das propriedades referentes aos materiais usados originalmente são geradas pelo somatório de diversas propriedades ou características que fazem com que estes filmes possam ser usados em uma grande variedade de aplicações como as mostradas na Figura 3, sendo usados desde o ramo da engenharia como é na construção de filmes ou membranas de filtração, energia, assim como na área médica incluindo sistemas de liberação de fármacos, biosensores e imobilizadores de enzimas (BHARDWAJ & KUNDU, 2010).



**Figura 3.** Aplicações usadas nas membranas produzidas por eletrofição. Fonte: próprio autor.

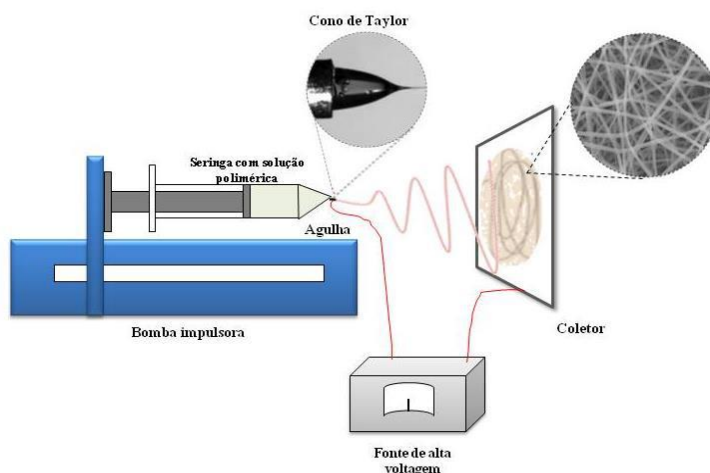
A eletrofição é uma técnica que usa uma solução polimérica submetida a um campo elétrico de alta voltagem. Jatos poliméricos são ejetados devido às cargas elétricas, produzindo fios finos que são depositados em um coletor. Estas estruturas fibrosas podem ser criadas usando um grande número de polímeros puros ou misturas. Existe também a possibilidade de incorporar diversos tipos de materiais como cerâmicos e/ou metais usando uma matriz polimérica como suporte, com o propósito de gerar variações significativas nas propriedades físico-químicas ou mecânicas dos materiais finais (BAEK *et al.*, 2015).

Segundo GAMBOA, MANTILLA e CASTILO (2007), o processamento por eletrofição consiste basicamente em colocar dentro da seringa uma solução ou polímero fundido, que é forçada a sair através de uma agulha metálica com uma velocidade constante mediante o uso de uma bomba impulsora (Figura 3). O processo é submetido a um campo elétrico, fazendo com que as cargas da massa fluida situada na ponta da agulha



interajam através de forças de atração e repulsão com a carga presente no coletor. Isto faz com que a tensão superficial da gota crie uma instabilidade, rompendo num jato que percorre uma distância efetiva com uma trajetória cônica, formando o chamado cone de Taylor. Este processo gera as condições necessárias para que os solventes presentes na solução sejam evaporados, permitindo a deposição das fibras do polímero completamente secas sobre um coletor ligado ao fio terra (DUQUE, RODRIGUEZ e LÓPEZ, 2013).

Na atualidade, o processo de eletrofiação conta com duas configurações padrões de trabalho. Dependendo da orientação ou da disposição da seringa que ejeta a solução polimérica, o sistema pode ter configuração vertical ou horizontal. Na Figura 4, é representado um sistema de eletrofiação em escala do laboratório com orientação horizontal. Este processamento é composto de uma seringa com agulha metálica, uma bomba reguladora de fluxo do polímero para controlar a quantidade de material ejetado, uma fonte de alta tensão e um dispositivo coletor o qual pode variar de uma placa plana a um cilindro rotatório dentre outras possibilidades (MITCHELL e DAVIS, 2011).



**Figura 4.** Representação do sistema horizontal de eletrofiação. Fonte: próprio autor

Para obter fibras finas pelo processamento de eletrofiação, estas devem possuir características ideais como: a formação de fibras contínuas que possuam superfícies livres de defeitos ou defeitos controláveis, além de possuir uma morfologia e diâmetros estáveis (CERBINO, 2013). Para gerar estas características, devem ser controladas diversas variáveis ou parâmetros que influenciam diretamente a morfologia das fibras. Segundo RAMAKRISHNA (2005), estes parâmetros são divididos em três grupos principais: 1) parâmetros alusivos à solução polimérica, 2) relacionados ao equipamento e 3) parâmetros ambientais. O entendimento da importância de cada um deles e sua influência na eletrofiação serão descritos separadamente.

### **3.5.1 Parâmetros referentes à solução**

As propriedades dos polímeros em solução correspondem ao parâmetro que mais influencia o processo de eletrofiação e a morfologia das fibras resultantes.

#### **3.5.1.1 *Peso molecular:***

O peso molecular do polímero representa o tamanho da sua cadeia polimérica, afetando a viscosidade da solução preparada e influenciando diretamente na conformação e morfologia das fibras produzidas. O peso molecular do polímero influencia diretamente as condições de emaranhamento e a movimentação das cadeias no solvente. Para obtenção de fios com melhor qualidade, ou seja, com pouca formação de “contas” e com pouca ruptura das fibras eletrofiadas, é preciso utilizar uma solução com viscosidade efetiva capaz de promover o alinhamento e orientação das cadeias poliméricas durante o processo de eletrofiação (GIL-CASTELL *et al.*, 2017).

#### **3.5.1.2 *Concentração:***

Segundo HUANG *et al.*, (2015) uma concentração de solução polimérica deve estar relacionada à quantidade de polímero dissolvido num solvente, o que é necessário para solvatar (cercar e afastar) as cadeias que compõem o polímero. Esta relação entre polímero solubilizado e solvente gerará uma das condições principais da eletrofiação, sua concentração. Esta variável é de grande importância no processo de eletrofiação, pois influencia diretamente a viscosidade da solução. Se uma solução polimérica vai ser eletrofiada, e possui uma concentração baixa, o processo gerará descontinuidades nas fibras formadas. Sendo assim, pode-se dizer que quanto menor a concentração na solução, maior será a formação de defeitos nas fibras (DIAS E BARTOLO., 2013).

#### **3.5.1.3 *Viscosidade da solução:***

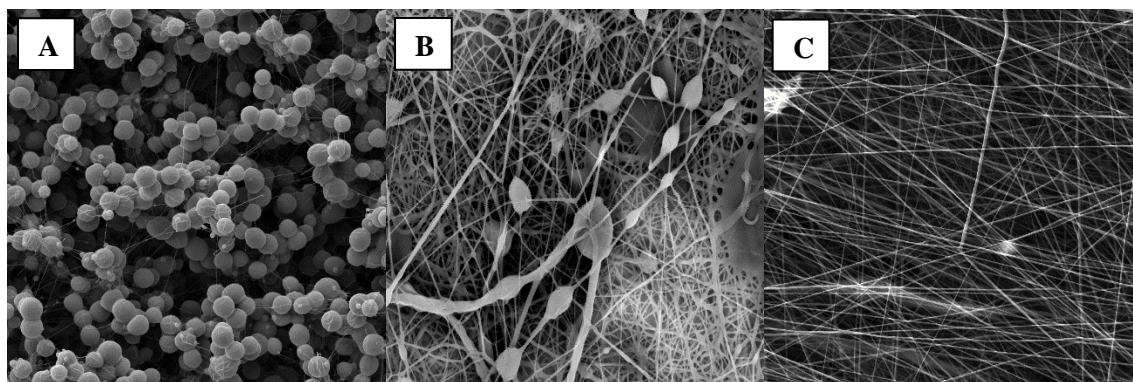
Como se tem citado, a viscosidade de uma solução polimérica depende principalmente da sua concentração e do peso molecular do polímero. Segundo CERBINO PEDRO (2013), altas viscosidades na solução usada para a eletrofiação gerará um aumento no diâmetro na fibra formada, em comparação com diâmetros obtidos pela eletrofiação de soluções mais diluídas. Uma das principais problemáticas referentes à alta viscosidade é que, neste caso, a solução pode secar na ponta da agulha antes de ser eletrofiada. Valores de viscosidade inferiores à requerida para o processamento gerarão

formação de defeitos ao longo das fibras devido à baixa presença do polímero na solução, aumentando a influência da tensão superficial do solvente no jato.

Além disso, no processo de eletrofiação pode se produzir também um jato secundário que ocorre a partir do jato principal (NISTA *et al.*, 2012). Este jato não é estável o suficiente gerando defeitos na produção de fibras com pequenos diâmetros para uma dada viscosidade. Se a solução possui uma viscosidade suficiente, a formação do segundo jato é pouco provável, sendo apenas o jato principal que irá contribuir para uma fibra com maior diâmetro.

#### 3.5.1.4 Tensão superficial:

A tensão superficial num fluido tem o efeito de diminuir sua área da superfície por unidade de massa fundida. Para dar início no processo de eletrofiação é preciso que esta massa polimérica situada na ponta da agulha seja carregada com o propósito de vencer a tensão superficial presente na gota da solução. No entanto, a variação da viscosidade favorecerá a interação entre as moléculas do polímero e o solvente. Quando a solução é esticada sob a influência das cargas submetidas, o solvente tenderá a se espalhar sobre as moléculas emaranhadas do polímero que não conseguirão se agregar, reduzindo assim a influência da tensão superficial. Em outras palavras, teremos uma maior interação entre as moléculas evitando a formação da instabilidade do jato (ZHU *et al.*, 2017). Caso ocorrer a instabilidade haverá o fenômeno denominado *electrospray* onde a solução se agregará em gotas, ou ocorrerá à formação da nano fibra com a presença de contas (Figura 5).



**Figura 5.** Morfologia das estruturas obtidas por eletrofiação. A) formação de contas (*beads*). B) combinação de contas e fibras. C) fibras contínuas. Fonte: próprio autor.

#### 3.5.1.5 Condutividade:

A condutividade da solução polimérica pode ser aumentada pela adição de íons ou pela adição de pequena quantidade de sais ou polieletrólitos na solução. O aumento da

carga pode gerar um estiramento da fibra, eliminando a probabilidade de formação de contas, além da diminuição do diâmetro das fibras produzidas (BARAKAT *et al.*, 2009). Assim, a voltagem crítica para ocorrer a eletrofiação diminui; entretanto, existe um limite para a redução no diâmetro das fibras, fazendo com que estas rompam em gotículas. Outro efeito importante do aumento das cargas é a criação de instabilidade na largura do cone de Taylor, e como resultados ocorre um aumento na área de deposição das fibras (LEVITT *et al.*, 2018).

Soluções preparadas com solventes com condutividade efetiva para diversos polímeros, geralmente dão origem a fibras contínuas livres de contas, enquanto que não haverá formação de fibras utilizando solventes não condutores. Na Tabela 1, são mostrados solventes comumente usados em eletrofiação com seus respectivos valores de condutividade.

**Tabela 1.** Viscosidade e tensão superficial de diferentes soluções usados na formação de fibras (adaptada: Ramakrishna, 2005)

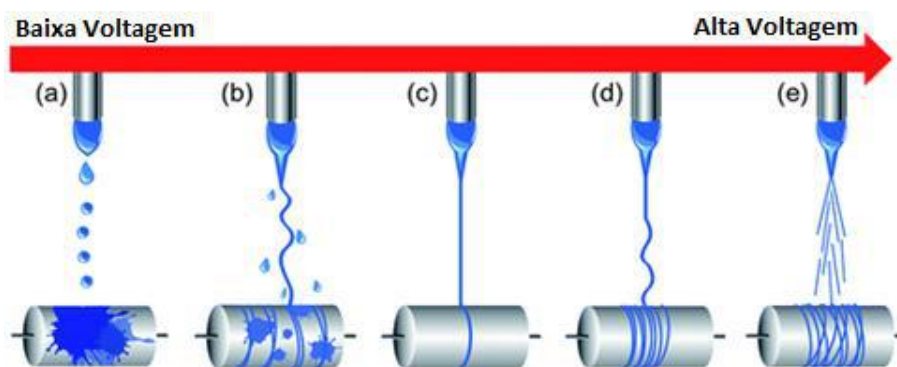
Polímero	Peso molecular	Solvente	condição limite da viscosidade e tensão superficial	Outros parâmetros e fiação
Oxido de polietileno (PEO)	$M_w = 900,000$	Água/Etanol (100:1~59:41)	<p><b>Fibras uniformes:</b>  Água/etanol: (69:31 ~59:41)  Viscosidade: 1129 ~1179 cPs  Tensão superficial: 55~51 mN/m.</p> <p><b>Fibras com contas:</b>  Água/etanol: (100:0 ~79:21)  Viscosidade: (402 ~889 cPs)  Tensão superficial: 76~60 mN/m.</p>	Concentração de polímero: 3% em peso; Voltagem: 11kV Distância: 21,5 cm.
Poli(p-dioxano-L-lático)-bloco-poli(etileno glicol)	$M_w = 42,000$	Diclorometano (MD)/DMF (100:0~40:60)	<p><b>Fibras uniformes:</b>  DM/DMF: (100:0~75:25)  Viscosidade: 125, 175 cPs  Tensão superficial: 39,35 mN/m.</p> <p><b>Fibras com contas:</b>  Água/etanol: (100:0 ~79:21)  Viscosidade: (402 ~889 cPs)  Tensão superficial: 76~60 mN/m.</p>	Concentração de polímero: 20% em peso; Voltagem: 15kV Distância: 11 cm.
Poliestileno (PS)	$M_w = 140,000$	Tetraidrofurano (THF)/DMF (100:0~0:100)	<p><b>Fibras uniformes:</b>  THF/DMF: (50:50)  Viscosidade: 45 cPs</p> <p><b>Fibras com contas:</b>  Água/etanol: (100:0~0:100)  Viscosidade: 42, 48 cPs</p>	Concentração de polímero: 13% em peso; Voltagem: 15kV Distância: 12 cm.

### 3.5.2 Condições do processamento

#### 3.5.2.1 Voltagem aplicada:

Um elemento de vital importância no processamento de eletrofiação é a aplicação de uma voltagem na solução. A alta voltagem induz as cargas necessárias na solução polimérica e associada ao campo elétrico externo favorece a distribuição das forças de atração e repulsão na gota situada na ponta da agulha. O processo de eletrofiação tem início no instante em que estas forças eletrostáticas superam a tensão superficial da solução. Geralmente, voltagens (positivas ou negativas) maiores que 6 kV promovem energia suficiente para deformar a gota e romper em fios formando o cone de Taylor. O efeito da voltagem não é somente responsável pela morfologia da fibra, mas também pela sua cristalinidade. O campo elétrico formado pode causar ordenação das moléculas do polímero, durante a eletrofiação, induzindo assim, uma maior cristalinidade (SUN *et al.*, 2015; RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

A influência da voltagem na conformação das fibras pode ser visualizada em três regiões separadamente (Figura 6). Uma voltagem aplicada inferior à requerida no processamento gerará a formação de gotas da solução polimérica (Figura 6a e 6b). Quando a voltagem usada na eletrofiação ultrapassa o seu limite (Figura 6c), ocorrerá uma desorganização no empacotamento das fibras no tecido produzido (Figura 6d e 6e).



**Figura 6.** Representação gráfica da influência da voltagem nas fibras. Adaptado de Huang *et al.* (2015)

Se a voltagem aplicada no processamento for alta, maior quantidade de cargas provocará uma aceleração do jato, que irá produzir um maior estiramento das fibras devido às forças de Coulomb, diminuindo assim o diâmetro das fibras e garantindo a evaporação completa dos solventes usados de forma mais rápida. Não obstante, a aplicação de uma voltagem muito elevada poderá gerar a formação de defeitos, isto é atribuído à instabilidade do jato (HUANG *et al.*, 2015).

#### **3.5.2.2 Vazão:**

A vazão é a variável do processamento que está diretamente ligada à quantidade de material a ser usado na conformação das fibras. Existe uma quantidade efetiva da solução polimérica para uma dada voltagem que manterá a estabilidade do cone de Taylor. Com um aumento da quantidade de material na ponta da agulha, o jato gerado requererá maior tempo para secar e o solvente depositado na fibra poderá não ter tempo suficiente para evaporar totalmente, mantendo resíduos dos solventes dentro das fibras. Estes solventes residuais podem fazer com que as fibras coletadas se unam, criando uma malha com aspecto de rede. Por isso, é desejável manter uma vazão menor, dando o tempo necessário para que os solventes iniciem sua evaporação desde a ponta da agulha. Também, quando a vazão é aumentada, existe um aumento correspondente no diâmetro da fibra ou pode ocorrer a formação de defeitos (BHARDQARJ E KUNDU, 2010).

#### **3.5.2.3 Coletor:**

As características do coletor assim como propriedades do material e formato, influenciam o filme produzido. Uma destas características é a condutividade do material. O coletor pode ser feito de um material condutor, assim como alumínio, conectado a um fio terra, o que criará uma diferença de potencial entre a fonte e o coletor. Se um coletor condutor é usado, as cargas serão dissipadas de tal forma que possibilitará maior deposição de fibras no coletor e um melhor empacotamento entre as fibras, o que significará ter filmes com densidades maiores. Se pelo contrário, o coletor for formado por um material não condutor, as cargas fornecidas serão acumuladas nele, gerando uma menor quantidade de fibras depositadas.

#### **3.5.2.4 Distância percorrida:**

A distância percorrida corresponde à distância existente entre a ponta da agulha e o coletor. Esta terá uma influência significativa entre o tempo de saída da solução até sua chegada ao coletor. Esta distância percorrida influenciará na evaporação dos solventes presentes. Desta forma, teremos fibras completamente secas se a distância for suficientemente grande permitir a evaporação do solvente. Do contrário, as fibras se depositarão no coletor contendo uma umidade residual, o que causará a sua compactação. No entanto, se a distância for muito grande, as fibras poderão se romper devido ao seu próprio peso, especialmente, se o diâmetro for muito pequeno. Se a distância for muito reduzida, o efeito do campo elétrico terá um incremento, o que poderá gerar uma

instabilidade do jato, propiciando a formação de contas ao longo das fibras, além da obtenção de uma geometria planar em forma de fitas nas fibras (HAIDER *et al.*, 2015).

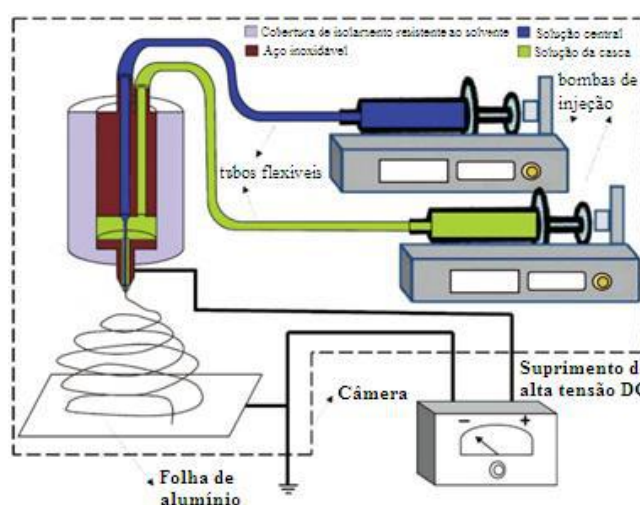
Segundo DUQUE *et al.*, (2013) a maioria dos estudos realizados na eletrofiação concordam que uma distância maior, permitirá um maior alongamento das fibras antes de serem depositadas no coletor.

### 3.5.3 Parâmetros referentes ao ambiente

A umidade do ambiente pode ter influência significativa na solução do polímero durante a eletrofiação, já que influenciará diretamente na velocidade de evaporação do solvente da solução. Umidade excessiva poderá originar a presença de poros circulares sobre a superfície das fibras. No entanto, a obtenção destes poros na superfície pode favorecer a transferência de diversos materiais como proteínas facilitando sua aplicação na engenharia tecidual. Igualmente uma umidade elevada promoverá condensação da água presente no meio sobre a superfície das fibras, apresentando variações na morfologia das fibras produzidas principalmente em solvente voláteis. (DUQUE *et al.*, 2013).

### 3.6 Eletrofiação coaxial

Novos avanços têm sido realizados na produção de biomateriais usando eletrofiação, como é o caso da fiação coaxial. Nela se aborda uma nova alternativa de tratamento de materiais que não podem ser eletrofiados através de configurações padrões anteriormente citadas. A eletrofiação coaxial é uma modificação da eletrofiação tradicional na qual, duas ou mais soluções são alimentadas usando duas bombas impulsoras através de um capilar coaxial para produzir nanofibras com uma estrutura núcleo – casca (Figura 7).

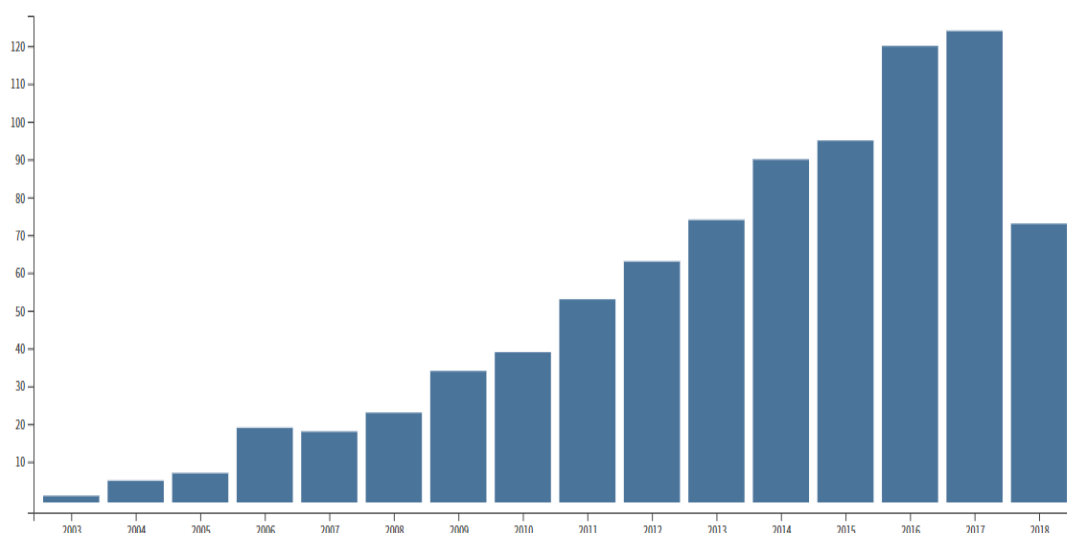


**Figura 7.** Representação de eletrofiação coaxial. Modificada de REZAEI *et al.*, 2005.



LOSCERTALES *et al.*, (2001) criaram jatos usando dois líquidos com baixa miscibilidade e conseguiram depositar gotículas micrométricas com estrutura coaxial compostas no núcleo por um dos líquidos usados com uma envoltura ou casca com outro líquido. No entanto, só um ano depois, eles conseguiram estabilizar o jato usando o mesmo sistema e assim obtiveram fibras com diâmetros nano ou micrométricos com estrutura do tipo núcleo – casca (*core – Shell*).

O número de estudos usando a eletrofiação coaxial tem crescido nos últimos anos, como se observa na Figura 8. Esta nova tecnologia para produção de mantas fibrilares pode ser usada para diversas aplicações, assim como sensores, membranas de filtração, biomateriais aplicáveis à engenharia tecidual, veículos para liberação de fármacos, sistemas contendo moléculas de fácil desnaturação ou degradação etc. (NAEIMIRAD *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2014).



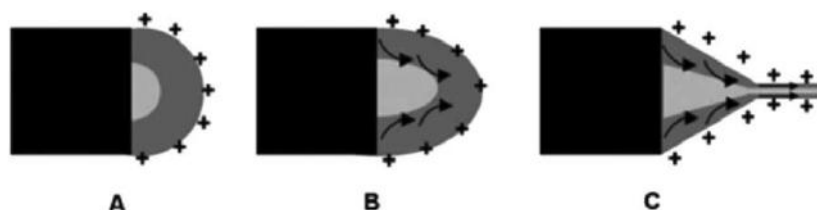
**Figura 8.** Publicações registradas para os termos electrospinning e coaxial. Base de dados web of Science.

Na eletrofiação coaxial, por ser uma variante da eletrofiação convencional, os princípios operacionais também podem ser aplicados e descritos como na eletrofiação monolítica (item 3.3). No entanto, por ter duas ou mais soluções que formem fios concêntricos núcleo – casca, devem se manter relação significativa entre os parâmetros tais como a voltagem de forma tal que esta forneça um campo elétrico eficaz para a geração das fibras utilizando as soluções envolvidas (KHAJAVI e ABBASIPOUR, 2012). Campos elétricos baixos permitiram a acumulação do material gerando gotejo das soluções, enquanto que cargas altas criaram desestabilizações no cone criando fibras



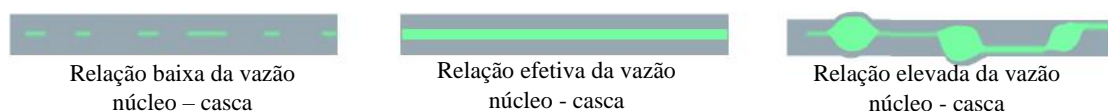
descontínuas ou mesmo a separação das soluções criando dos jatos simultâneos (HUANG *et al.*, 2017).

Quando o polímero em solução é carregado, o acúmulo das cargas de atração e repulsão predominam sobre solução da casca fazendo com que as tensões geradas nesta promovam o cisalhamento da solução do núcleo fazendo com que as forças de atrito e arraste viscoso entre as duas camadas das soluções sejam deformados e expulsados um jato cônico como é mostrado na Figura 9.



**Figura 9.** Distribuição das cargas elétricas na formação do jato núcleo – casca. NAEIMIRAD *et al.*, 2018.

Uma vazão alta da solução que gera o núcleo favorece a formação de contas dentro da outra fibra (casca), enquanto que vazões menores geram descontinuidades no núcleo (Figura 10). Por outra parte, a vazão da casca está diretamente relacionada com a espessura da mesma, vazões maiores criaram espessuras maiores. Sendo assim para obter fibras núcleo – casca eficazes deve seguir uma relação de vazões de forma tal que a vazão do núcleo sempre será menor que a vazão da casca (GOLÇALVES, 2015).



**Figura 10.** Razão da vazão da solução que forma o núcleo em relação à solução que forma a casca (GOLÇALVES ET AL., 2015)

Outra variável a ser estudada no processamento coaxial, é a viscosidade das soluções. Deve-se utilizar uma solução da casca com viscosidade efetiva que permita a formação do cone de Taylor junto com a estrutura núcleo – casca. Por outro lado, a viscosidade do núcleo deve ter um valor mínimo para que permita a sua fiação contínua ao longo do fio formado pela solução da casca (LI *et al.*, 2010).

A natureza química dos solventes usados também deve ser levada em consideração a fim que uma das soluções não desestabilize a outra, causando a sua precipitação e afetando, assim, a formação do jato, além de criar possíveis obstruções na agulha. Também é importante garantir que o solvente usado no núcleo não possua pressão de

vapor elevada de forma a evitar a separação do núcleo da casca devido a formação de uma camada de vapor entre o núcleo e a camada da casca (NAEIMIRAD *et al.*, 2018).

XIONG *et al.*, (2005) demonstraram que a eletrofiação de dois capilares coaxiais poderia ser usada na geração de fibras núcleo – casca constituído por dois líquidos não miscíveis. No entanto, a ruptura deste jato eletrificado levou à formação de partículas isoladas dos núcleos, assim como a formação de fibras compostas por diferentes tipos de polímeros. Por isso que foi estudado este problema, foi encontrada a possível solução com a implementação de duas soluções imiscíveis, facilitadas pela reticulação e assim estabilização da casca. Desta maneira foram produzidas nanofibras de núcleo – casca com diversidade nos diâmetros, assim como uma variedade nas espessuras da casca e diâmetro do núcleo que poderiam ser fabricadas usando esta configuração.

ZHAO *et al.*, 2007. Combinaram as propriedades do PCL e da gelatina, usando a conformação dos fios núcleo-casca elaborados por eletrofiação coaxial. Para a formação das fibras núcleo – casca, foi usado como solvente o tri-fluoroetanol (TFE). Usando concentração para cada uma das soluções eletrofiadas como PCL/TFE e gelatina/TFE de 14,3% p/v e 17% p/v respetivamente. Onde, as melhores fibras obtidas foram usando uma vazão do núcleo aproximada de 8,0 mL/h,

Utilizando no centro das fibras o PCL que aporta nas fibras resistência mecânica e estabilidade. Enquanto que a adição da gelatina na camada externa como casca, favorecerá a adesão, o crescimento e a proliferação celular no arcabouço. Foi usado com além do aproveitamento da bioatividade dos dois materiais, criarão filmes com características próximas do tecido natural com boas condições de crescimento e proliferação, o que o converte em uma alternativa ótima na aplicação na regeneração de tecido dérmico.

### **3.7 Biomateriais para regeneração de pele**

Os materiais comumente usados na regeneração da pele são polímeros naturais obtidos a partir de diferentes fontes principalmente de animais, resíduos agrícolas (amido etc.) e mesmo até da produção industrial, assim como também da sua combinação. Fibrina, albumina e colágeno são exemplos de proteínas utilizadas.

Além dos materiais de origem natural também são usados materiais poliméricos sintéticos biodegradáveis como o PCL, PHB, PVA etc. Neste trabalho se fará referência ao colágeno tipo I como o material de fonte natural, biodegradável que promove a regeneração de feridas da pele diminuindo a possibilidade de rejeição do biomaterial,

devido a sua presença na MEC da pele. No entanto, o processo de eletrofiação do colágeno puro produz fibras com baixas propriedades mecânicas comparadas com as da pele, sendo necessário a incorporação de um material polimérico biodegradável que ao ser misturado com o colágeno aumente as ditas propriedades, melhorando as condições de manuseio dos filmes produzidos.

### 3.7.1 Colágeno tipo I

O colágeno é uma proteína fibrosa de origem animal, considerada como a proteína principal que compõe os tecidos dos animais vertebrados. É principalmente encontrada nos tecidos conjuntivos, como a pele, cartilagem, ossos, tendões, dentes, vasos sanguíneos, intestinos etc. É formada por cadeias peptídicas (denominadas  $\alpha$ ) dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina. Essas cadeias são organizadas de forma paralela a um eixo, formando as fibras de colágeno, que proporcionam resistência e elasticidade à estrutura (FRATZL, P. 2008). Existe uma grande variedade de tipos de colágenos, na qual sua classificação principal é dada pela característica macromolecular da tripla hélice, no entanto, só alguns são usados para produzir biomateriais como é registrado no Quadro 1 (VON DER WEID e MEDINA, 2016) dentre os mais nomeados estão o tipo I, II, III e V.

**Quadro 1.** Composição e distribuição dos diversos tipos de colágeno. VON DER WEID e MEDINA.

TIPO	COMPOSIÇÃO	DISTRIBUIÇÃO
I	$[\alpha_1(I)]\alpha_2(I)$	Pele, tendão, ossos, córnea.
II	$[\alpha_1(II)]_3$	Cartilagem, humor vítreo.
III	$[\alpha_1(III)]_3$	Vasos sanguíneos, trato gastrointestinal.
IV	$[\alpha_1(IV)]_2\alpha_2(IV)$	Membrana basal

A principal função do colágeno é contribuir com a integridade estrutural da MEC, além de auxiliar na fixação de células à matriz.

Formando fibras finas e longas com valores estimados em 500  $\mu m$  de comprimento e 500 nm de diâmetro. Como o colágeno é o principal componente da pele, correspondendo num 60-80% de seu peso seco sem contar com a gordura que a compõe, ele tem sido muito estudado e aplicado para tratamento de pele (ZEUGOLIS *et al.*, 2008).

O colágeno tipo I contém entre 31 – 38 resíduos da lisina em cada cadeia de colágeno. Possui uma estrutura helicoidal de três hélices feita por três cadeias polipeptídicas (Figura 11) que podem ser facilmente reconstituídas numa matriz fibrilar com o incremento do pH e a temperatura da solução precursora do colágeno ácido. Uma

vantagem chave dos hidrogéis do colágeno é a capacidade de suportar a adesão de células e de espalhamento, uma vez que o colágeno tipo I tem uma variedade de domínios que são ligados aos receptores da superfície celular e a outras proteínas de MEC, como a fibronectina entre outras. (ORGEL *et al.*, 2005).

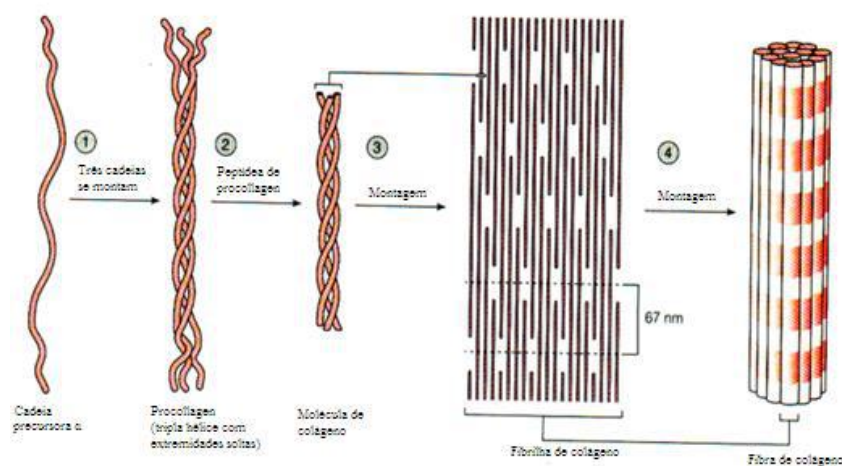


Figura 11. Representação da estrutura do Colágeno tipo I. Adaptada de ORGEL *et al.*, 2005.

Outra característica do colágeno é que o número e locais de resíduos da lisina em uma molécula de colágeno são altamente conservados entre os humanos, os ratos, e várias espécies de bovinos. Esta diferença na composição dos aminoácidos entre diferentes espécies resulta em uma imunogenicidade clínica mínima para aplicações médicas, incluindo enchimentos dérmicos, estéticos e curativos para cicatrização. Atualmente, existem três tipos de aplicações referentes aos substitutos dérmicos de forma natural os quais são classificados pela obtenção. A primeira forma de obter o colágeno é pela derme derivada da pele a qual é doada para os bancos de pele retirada principalmente da Allodermis de humanos, outra forma de obter colágeno, é mediante a extração da derme suína ou bovina, a terceira forma de obtenção do colágeno tipo I é pela extração das caudas de ratos.

Estudos têm sido desenvolvidos com diversos materiais compostos por colágeno para curativos usados na regeneração de tecidos como foi citado na revisão feita por CIPITRIA, *et al.*, (2011) e mostrado no Quadro 2.

**Quadro 2.** Aplicações em arcabouços de Colágeno

Estudo	Resultados obtidos	Referências
Observation of Triple Helix Motif on Electrospun Collagen Nanofibers and its Effect on the Physical and Structural Properties	A avaliação da estrutura helicoidal do colágeno foi avaliada neste trabalho após a eletrofiação. Foi usada solução de ácido acético 0,5 M e etanol com relação volumétrica 1:1. Foi observado que a cadeia principal do colágeno sofreu desnaturação no processamento na eletrofiação quanto na solubilização. No entanto, foi possível identificar a estrutura tripla hélice própria do colágeno em algumas regiões das fibras eletrofiadas usando MEV e MET.	BURCH <i>et al.</i> , 2017.
Electrospun Collagen: A Tissue Engineering Scaffold with Unique Functional Properties in a Wide Variety of Applications	Filmes de fibras na escala micro ou nanométrica de colágeno tipo I (esC) foram produzidas por eletrofiação e comparados com filmes fibrilares eletrofiados produzidos de gelatina (colágeno desnaturado). Estes ensaios mostraram que a gelatina eletrofiada (esG) não possuía as cadeias $\alpha$ intactas do colágeno tipo I, sendo composta por fragmentos de peptídeos proinflamatórios. Foi observado que os filmes de colágeno I mantiveram as cadeias $\alpha$ intactas e enriquecidas com a unidade $\alpha_2$ , o que pareceu definir as diversas propriedades biológicas e funcionais dos filmes produzidos pelos dois materiais.	JHA et al., 2011.
Electrospinning of collagen nanofibers.	Foram produzidas nanofibras de colágeno tipo I (pele de bezerro) usando 1,1,1,3,3,3 hexafluoruro-2-propanol (HFP) como solvente. As medições dos diâmetros das fibras foram de 67 nm, valor característico do colágeno nativo. Foi possível adaptar as propriedades mecânicas da matriz controlando a orientação das fibras com o uso de um coletor cilíndrico rotatório. As fibras de colágeno eletrofiadas promoveram o crescimento celular e a penetração de células na matriz produzida. Desta forma, os autores consideraram que estes filmes seriam um arcabouço quase ideal para engenharia tecidual.	MATTHEWS <i>et al.</i> , 2002.

A baixa resistência mecânica dos filmes produzidos à base de colágeno puro têm sugerido a mistura com materiais poliméricos sintéticos para a obtenção de compósitos que apresentem melhoria nesta propriedade, além de modificar morfológica e biologicamente os filmes. Dentre os materiais mais usados para formar compósitos com colágeno encontra-se a hidroxiapatita, Policaprolactona (PCL), poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) e poli(ácido glicólico) (PGA).

### 3.7.2 Policaprolactona (PCL)

O PCL é um poliéster termoplástico, linear, semicristalino que apresenta uma estrutura flexível e alta hidrofobicidade. Possui boa solubilidade em uma ampla gama de solventes dentre os quais se encontram: clorofórmio, diclorometano, tolueno, benzeno

etc. As características especiais que descrevem o PCL são variadas como baixo ponto de fusão e temperatura de transição vítrea. Estas e outras propriedades do PCL são mostradas no Quadro 3.

**Quadro 3.** Propriedades da policaprolactona (MARCK J, Polymer Data Handbook.)

PROPRIEDADES	VALOR	UNIDADES	CONDIÇÕES
Peso molecular por unidade	114	g/mol	-
Peso molecular médio	74.000	g/mol	GPC
Viscosidade Intrínseca	0,9	cm <sup>3</sup> /g	Viscometria de solução diluída
Termodinâmica de polimerização a 25°C e 1 atm.			
Cristalinidade	69	%	DSC
Elongação	700	%	-
Temp. de transição vítrea (T <sub>g</sub> )	-72	°C	DSC
Temp. de Fusão (T <sub>m</sub> )	58	°C	DSC
Calor de Fusão	8,9	KJ/mol	DSC

Devido a sua propriedade de biodegradação, o uso do PCL na área medica tem aumentado nos últimos anos, sendo usado na fabricação de arcabouços para engenharia tecidual, sistemas na liberação de fármacos e embalagens etc.

Em particular, na aplicação para regeneração de pele além de proporcionar condições próprias para o crescimento do tecido entre a sua estrutura, arcabouços de PCL podem servir como agente carregador de substancias que ajudam o processo de cura mediante um sistema de liberação de um material ativo ou fármaco. O perfil de liberação controlada do fármaco pode ser ajustado para atender uma aplicação clínica específica, modulando uma variedade de parâmetros, tais como a razão entre fármaco e polímero, diâmetro, morfologia e/ou porosidade da fibra. Os arcabouços de nanofibras eletrofiadas podem se ajustar para uma libertação controlada com tempos longos antes da sua degradação, isto diminui a frequência de aplicação tópica para aumentar a adesão do paciente. Os arcabouços de nanofibras são maleáveis, tornando-os adequados para aplicações de administração tópica de fármacos.

Estudos realizados por Li *et al.* (2007) exploraram a fabricação de matrizes nanofibrosas biodegradáveis alinhadas obtidas via eletrofiação usando um coletor rotatório. Suas propriedades mecânicas foram caracterizadas em função dos parâmetros de produção. Mostrou-se que a organização da nanofibra dependia da velocidade de rotação do alvo; As fibras orientadas aleatoriamente (33% de alinhamento de fibras) foram produzidas em um eixo estacionário, enquanto que fibras altamente orientadas (94% de alinhamento de fibras) foram produzidas quando a velocidade de rotação foi

aumentada para 9,3 m/s. Os filmes não alinhados tinham um módulo de elasticidade em tração isotrópico de  $2,1 \pm 0,4$  MPa, em comparação com as matrizes altamente anisotrópicas, cujo módulo era de  $11,6 \pm 3,1$  MPa na direção da fibra produzida, sugerindo que o alinhamento das fibras tem um efeito significativo nas propriedades mecânicas dos arcabouços. A anisotropia mecânica foi mais evidenciada para velocidades de rotação maiores, apresentado um aumento de 33 vezes do módulo de Young na direção da fibra, em comparação com a direção perpendicular, a uma velocidade de rotação de 8 m/s.

Outro estudo registrado na literatura demonstrou a possibilidade de fiação do PCL com adição de extratos naturais como agente ativo para sua liberação. HOSSEINKAZEMI *et al.* (2015), eletrofiaram PCL usando clorofórmio e dimetilformamida (1:1) como solventes. Foi agregado extrato hidro alcoólico de *Calendula officinalis*, incrementando a concentração em 5, 10 e 20%, observando que apresentou aumento no diâmetro meio das fibras 381 (PCL) e 726 nm (PCL/*C. officinalis*) com o incremento do extrato na solução de PCL. Por outro lado, foi observado diminuição do ângulo de contato ao aumentar a concentração do extrato mostrando diferença de  $100^\circ$  entre o filme obtido com PCL puro e o filme de PCL + 30% de *C. officinalis*. Favorecendo amostra que também mostrou melhoras na citotoxicidade mostrando favorecimento na proliferação de células no filme avaliado, o que demonstrou incremento na biocompatibilidade do filme com o aumento do extrato.

### **3.8 Filmes de colágeno/PCL produzidos por eletrofiação**

Vários esforços têm sido desenvolvidos para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes eletrofiados de colágeno. Uma das alternativas tem sido a introdução de polímeros sintéticos biodegradáveis, como o PCL, em matrizes de colágeno, com o objetivo de atingir as condições requeridas que favoreçam o crescimento e a regeneração da pele. Alguns destes estudos são citados na Quadro 4.

**Quadro 4.** Trabalhos desenvolvidos sobre fibras eletrofiadas de colágeno/PCL para tratamento em pele.

Título dos artigos	Estudos realizados	Referências
Novel approach towards aligned PCL-Collagen nanofibrous constructs from a benign solvent system	Fabricação de nanofibras alinhadas de policaprolactona-colágeno (PCL-Coll) por eletrofiação monolítica usando como solvente ácido acético diluído (AcOH) e diâmetros na faixa de 100 – 200 nm. Foi aumentada a solubilidade do PCL no AcOH usando tratamento ultra-sônico. AcOH foi diluído para 90%, concentração ideal para eletrofiação. As soluções finais foram centrifugadas em várias condições e coletadas com diferentes configurações de coletor para determinar condições de processamento ideais para a fabricação de nanofibras altamente alinhadas.	DIPPOLD <i>et al.</i> , 2017
Collagen coated electrospun polycaprolactone (PCL) with titanium dioxide (TiO <sub>2</sub> ) from an environmentally benign solvent: preliminary physico-chemical studies for skin substitute	Avaliação da biocompatibilidade das mantas eletrofiadas de PCL recobertas com colágeno. Este recobrimento foi realizado por imersão das fibras em uma solução de colágeno. Para confirmar a impregnação do colágeno, observou-se a redução no valor do ângulo de contato em comparação com as mantas de PCL sem o recobrimento..	GHOSAL <i>et al.</i> , 2014.
Engineered Human Skin Fabricated Using Electrospun Collagen – PCL Blends: Morphogenesis and Mechanical Properties	Obtenção de nanofibras por eletrofiação de colágeno e PCL. A utilização de uma solução composta de PCL com colágeno para a formação de matrizes não apresentou risco de perda de biocompatibilidade. Foi conseguido um aumento considerável nas propriedades mecânicas para sua aplicabilidade na engenharia tecidual da pele. Os filmes de fibra de colágeno/PCL foram cultivados com queratinócitos epidérmicos humanos e fibroblastos dérmicos, que promoveram a formação da epiderme e derme bem estratificada com camadas de células basais contínuas e membrana basal.	POWELL E BOYCE, 2009.
Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun PCL-Collagen Nanofibers Using Fibroblasts	Foram produzidos filmes nanoestruturados via eletrofiação coaxial compostos por PCL no núcleo e colágeno tipo I na casca, como solventes foram usados HFIP e TFE. Foi avaliada a proliferação de fibroblastos humanos sobre a superfície das fibras aproveitando a biocompatibilidade oferecida pelo colágeno. Ouve um aumento na proliferação e morfologia das células dérmicas cultivadas nos filmes de PCL/colágeno nos primeiros 6 dias em comparação com os filmes de nanofibras de PCL.	ZHANG <i>et al.</i> , 2005.



# CAPÍTULO IV

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Para a confecção dos filmes foram usados três materiais poliméricos: Colágeno tipo I, poli (álcool vinílico) e policaprolactona adquiridos comercialmente e usados como recebidos. Suas características estão listadas a seguir:

- **Colágeno tipo I obtido de tendão bovino (Col)**. Procedência: Sigma – Aldrich; Código: C9879, lote # 061M7015;
- **Policaprolactona (PCL)**, Procedência: Sigma – Aldrich,  $M_n$ : 70,000 – 90,000 g/mol; grau de hidrólise: 98%, Código: 1001419114, lote # MKBK2903V;
- **Poli (álcool vinílico) (PVA)**, procedência: Sigma – Aldrich,  $M_n$ : 85000 – 124000 g/mol, grau de hidrólise: 99%, lote # MKCC6452.

Para a produção das fibras por eletrofiação foram testados vários solventes para solubilizar o PCL, assim como também para a mistura de PVA/Colágeno. Foram usados solventes reportados na literatura como os listados na Tabela 2 (DULNIK *et al.*, (2016);

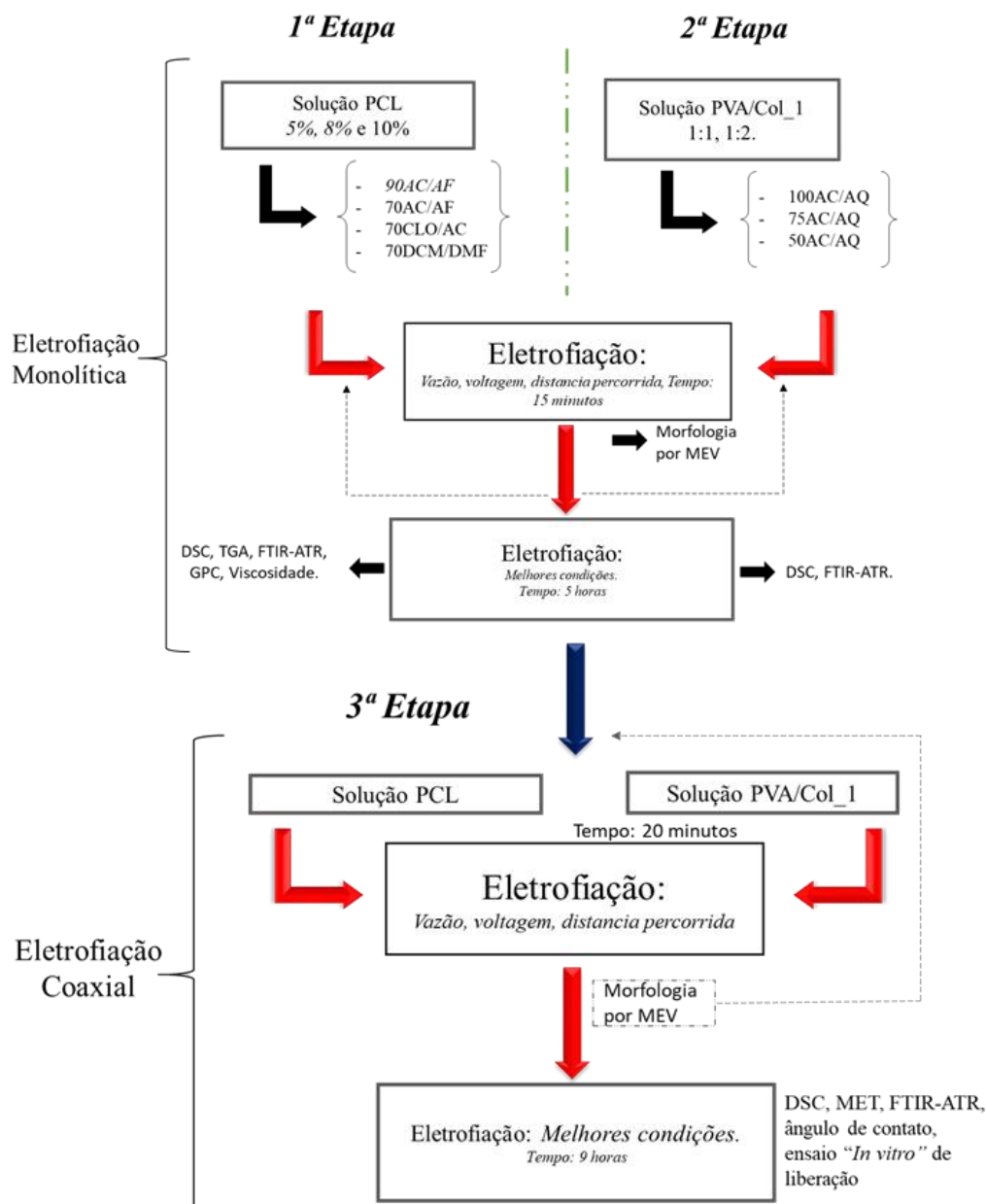
**Tabela 2.** Características dos Solventes utilizados na eletrofiação

Solvente	Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	Tensão superficial ( $\text{mN/m}$ )	Temp. evaporação ( $^{\circ}\text{C}$ )	Fabricante
Ácido acético	6,2	26,9	118	Vetec Química Fina LTDA
Ácido fórmico	58	37,0	101	Vetec Química Fina LTDA
Clorofórmio	4,8	26,5	61	Vetec Química Fina LTDA
Dimetilformamida	38,3	37,1	153	Vetec Química Fina LTDA
Diclorometano	9,1	27,2	40	Wako Industrias

### 4.2 Metodologia

A produção das fibras monolíticas de PCL e de Colágeno por eletrofiação envolveu diversas atividades relacionadas com a preparação das soluções a serem eletrofiadas. Inicialmente foi feito o estudo da concentração, mais adequada para obtenção de nanofibras. Em seguida foi verificada a influência dos solventes utilizados na eletrofiação, na morfologia das fibras obtidas. Finalmente, os filmes foram avaliados

quanto a composição, morfologia e estabilidade térmica. Estas etapas são resumidas na Figura 12.



**Figura 12.** Esquema simplificado da metodologia e caracterizações.

### 4.3 Preparo das soluções.

A obtenção de filmes com fibras contínuas e diâmetro homogêneo foi possível somente após a obtenção dos parâmetros ideais para cada material. Para isso foi realizado a eletrospinning monolítica inicialmente do PCL e do colágeno tipo1 + PVA separadamente. As variáveis estudadas no sistema foram: voltagem, vazão, concentração e um sistema de solventes, bem como a viscosidade e a condutividade da solução. Para a eletrospinning do

PCL puro foi possível obter os parâmetros ideais, mas para o colágeno puro não foram obtidas fibras. Desta forma, foi adicionado PVA ao colágeno.

#### **4.3.1 Solubilização do PCL.**

##### **4.3.1.1 Ácido Acético/Ácido Fórmico (AC/AF)**

Na obtenção de um sistema de solventes foram usados o ácido acético (AC) e o ácido fórmico (AF) na relação volumétrica de 9:1 (90AC/AF), segundo DULNIK *et al.*, (2016). Usando este sistema de solventes foi estudada a concentração ideal para a eletrofiação monolítica. Posteriormente, foi utilizada uma segunda relação de solvente de 7:3 (70AC:AF) para analisar a influência do ácido acético na solubilidade do polímero.

No estudo da concentração foram preparadas três soluções de PCL com 5, 8 e 10 % (massa/volume) e colocadas sob agitação magnética por 12 horas a temperatura ambiente, utilizando como solvente o sistema composto pela relação volumétrica 90AC/AF (90% de AC). Posteriormente, foi preparada uma solução de 10% m/v usando o sistema de solvente 70AC/AF com iguais condições de preparo que o primeiro sistema descrito.

##### **4.3.1.2 Clorofórmio/ácido Acético (CLO/AC)**

Um segundo sistema de solventes foi utilizado neste trabalho com o objetivo de avaliar a incorporação do ácido acético (AC) no clorofórmio (CLO) e sua influência como sistema de solventes para o processo de eletrofiação, tendo em consideração que o clorofórmio é o solvente mais utilizado para o solubilizar o PCL. Preparou-se uma solução com 10% (m/v) usando uma relação volumétrica de 7:3 de CLO:AC. Esta solução foi submetida a agitação magnética por 12 horas a temperatura ambiente. O PCL foi solubilizado em CLO por 10 horas. Em seguida, foi adicionado o ácido acético completando assim a relação volumétrica. A solução foi agitada por mais 2 horas.

##### **4.3.1.3 Dimetilformamida/Diclorometano (DCM/DMF)**

O terceiro sistema de solventes utilizado DCM/DMF baseou-se no reportado na literatura. O diclorometano, também é um solvente muito usados para solubilizar o PCL. Porém, ele não possui uma distribuição de cargas elétricas favoráveis para a produção de fibras poliméricas eletrofiadas. Assim, foi necessária a incorporação de dimetilformamida como um potencializador na distribuição de cargas na eletrofiação. Este sistema de

solventes foi preparado utilizando uma relação volumétrica de 7:3 (DCM/DMF). O PCL foi solubilizado (10% m/v) no DCM sob agitação magnética por 11 horas. Em seguida, foi adicionado DMF continuando a agitação por mais uma hora a temperatura ambiente, segundo o descrito por GONÇALVES. (2015).

#### **4.3.2 Solubilização do PVA/Colágeno I.**

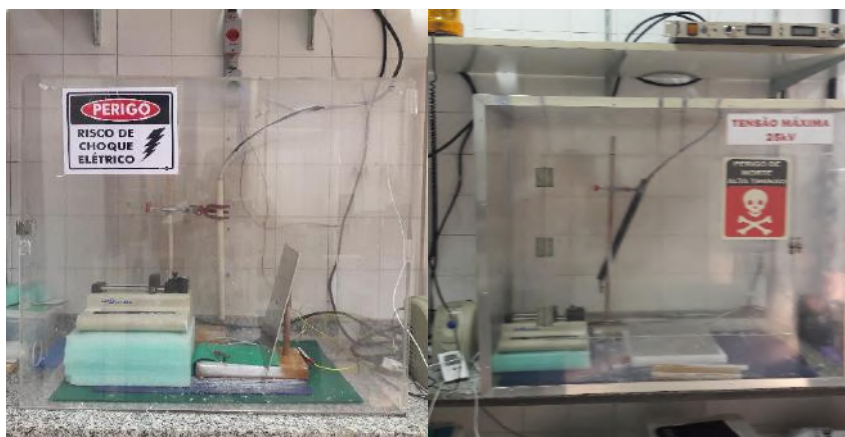
Como é reportado na literatura, o ácido acético (AC) é um dos agentes químicos usados nos processos de extração do colágeno tipo I das suas fontes naturais (ALEXANDRE *et al.*, 2017). Por isso, decidiu-se usar este solvente para solubilizar o colágeno neste estudo. Na tentativa de evitar uma possível degradação e/ou quebra da triple hélice característica do colágeno tipo I causada por outros solventes durante a eletrofiliação do colágeno.

Foi estudada a solubilidade do colágeno tipo I em um sistema de solventes baseado em uma mistura composta por Ácido acético (AC) glacial e água MilliQ (AQ). Foi variada a relação volumétrica dos solventes em 9:1, 7:3, 5:5 de AC:AQ. A solução foi submetida a agitação magnética constante a uma temperatura de 80°C por um tempo de 8 horas. Foi fixada a concentração do colágeno em 4% (m/v), enquanto que a concentração de PVA foi variada usando 0%, 2% e 4% (m/v).

#### **4.4 Processo de eletrofiliação monolítica**

Neste trabalho, foi utilizado o equipamento de eletrofiliação do Laboratório de Catálises para Polimerização, Reciclagem e Polímeros Biodegradáveis (LCPRB) do Instituto de Macromoléculas professora Eloisa Mano IMA-UFRJ, mostrado na Figura 13. Este sistema conta com uma fonte de alta voltagem modelo PS/FC 60p02.0-1, uma bomba injetora para seringa KDS serie 100 e uma placa coletora de alumínio aterrada a qual foi forrada com papel alumínio para facilitar a retirada dos filmes. O sistema de eletrofiliação encontra-se isolado dentro de caixas de acrílico para segurança de operação.

Foram realizados testes para o processamento de eletrofiliação monolítica do PCL e para o sistema composto por PVA/colágeno tipo I. Foi usado equipamento com montagem horizontal realizando variações na concentração, voltagem e vazão. As condições ambientais trabalhadas para este processamento foram: temperatura média de operação igual a 28°C e umidade relativa de aproximadamente 47%.



**Figura 13.** Sistema de eletrofição do LCPRB do IMA-UFRJ. Fonte: Próprio autor.

#### 4.4.1 Eletrofição do PCL.

Para a eletrofição monolítica do PCL, colocaram-se 5 mL de cada uma das soluções poliméricas numa seringa plástica com agulha metálica de 24 G com diâmetro interno de 0,5  $\mu\text{m}$ . A distância percorrida utilizada foi variada na faixa de 10 – 20 cm, as amostras foram coletadas após de 20 min de eletrofição com o objetivo de avaliar a morfologia das fibras obtidas. Variou-se a voltagem, a concentração e a vazão para cada sistema de solventes. As faixas das condições trabalhadas foram registradas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros utilizados na eletrofição monolítica do PCL.

Solução	Concentração (% m/v)	Voltagem (kV)	Distância (cm)	Vazão (mL/h)
<b>90AC/AF</b>	5%	10,0-20,0	15	0,5 - 1,0
	8%			
	10%			
<b>70AC/AF</b>	10%			
<b>CLO/AC</b>	10%			
<b>DCM/DMF</b>	10%			

A morfologia das fibras foi avaliada usando microscopia eletrônica de varredura (MEV) para cada um dos filmes obtidos com as variações descritas na Tabela 3. Foram consideradas como melhores condições experimentais para cada sistema de solventes as que possibilitaram a formação de fibras com diâmetros homogêneos, assim como a menor presença de contas e/ou defeitos. Estas condições foram utilizadas para cada um dos sistemas de solventes e as soluções foram eletrofiadas por 5 horas. Com a finalidade de realizar as caracterizações térmica (TGA, DSC) e química (FTIR) assim como para avaliar a influência dos solventes na formação das fibras e na cristalinidade do PCL.

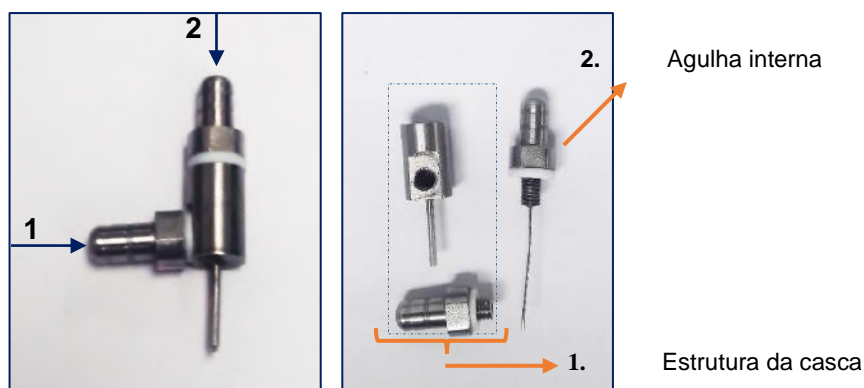
#### 4.4.2 Eletrofiação do PVA/Colágeno I.

Foram eletrofiadas 4 amostras de colágeno tipo I (Col I) e poli(álcool vinílico) (PVA). A concentração do colágeno foi fixada em 4% (m/v), enquanto que a concentração de PVA na solução foi variada para cada uma das amostras (0, 2 e 4 % m/v). As condições de processamento para estas soluções foram: distância percorrida de 12 cm, voltagens usadas na faixa de 15 – 20 kV e vazão de processamento entre 0,06 – 0,8 mL/h.

#### 4.5 Processo de eletrofiação coaxial

Uma vez encontradas as condições de eletrofiação para as fibras monolíticas de PCL e Col\_1/PVA. Foi dado início para a formação do processo de eletrofiação coaxial usando um sistema vertical, com o objetivo de favorecer a obtenção de fibras tipo núcleo – casca.

Foi usado dispositivo para este sistema (agulha coaxial) de forma que o núcleo das fibras fosse composto por PCL e recobertas pela mistura de Col\_1/PVA formasse a casca (Figura 14).



**Figura 14.** Dispositivo usado na formação da fibra coaxial, com as partes que a compõem. 1) Solução de Col\_1/PVA; 2) Solução de PCL. Fonte: próprio autor.

Para obter os valores das variáveis requeridas para formar este tipo de fibras, foram testados os seguintes parâmetros: voltagem na faixa de 15 a 20 kV, distância percorrida entre 10 – 15 cm, vazões para o núcleo (PCL) entre 0,05 e 0,08 mL/h e vazões para a formação da casca (Col\_1/PVA) entre 0,2 – 1,0 mL/h.

Após os ensaios preliminares, as soluções foram submetidas à eletrofiação coaxial por 9 horas, usando as seguintes condições de processamento: vazão de Col\_1/PVA: 0,2 mL/h, vazão do PCL: 0,07 mL/h, voltagem aplicada: 19 kV, distância percorrida: 12 cm.

## **4.6 Técnicas de caracterização**

### **4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A morfologia da superfície dos filmes e das fibras de PVA/Colágeno tipo I, PCL puro, assim como das fibras núcleo/casca de PCL – Col\_1/PVA foram avaliadas com auxílio de um Microscópio Eletrônico de Varredura Tescan VEGA3 – República Checa, usando uma aceleração de 15 KV do núcleo multiusuário de microscopia do PEMM/COPPE/UFRJ. As amostras usadas foram recobertas com ouro na hora de fazer a análise. Os diâmetros das fibras que formam os filmes foram medidos realizando tratamento das imagens pelo software *Sizer Meter 1.1*. Para quantificar o diâmetro médio das fibras foram tomadas 50 medidas de cada amostra.

### **4.6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A morfologia das fibras núcleo – casca foi avaliada com auxílio do microscópio eletrônico de transmissão MORGANI – FEI Company 80KV, do Centro Nacional Estrutural e Bioimagem (CENABIO) – UFRJ. Com o objetivo de comprovar que as fibras produzidas estavam recobertas pelo colágeno e que o núcleo de PCL das fibras possuía continuidade ao longo do material. A eletrofição foi feita diretamente no porta amostra. Os diâmetros dos fios produzidos foram medidos usando o software *Size Meter 1.1*, com o qual foi possível obter o diâmetro interno (núcleo) e a espessura da casca das fibras.

### **4.6.3 Microscopia de Fluorescência**

O recobrimento das fibras núcleo – casca também foi avaliado usando microscópio óptico com fluorescência LEICA DFC-310 FX do Laboratório de Biomateriais e Bioengenharia do PEMM/COPPE. As amostras foram eletrofiadas sobre uma lamina de vidro, depositando uma camada fina. Foi adicionado 25 µL/ml de rodamina na solução de Col\_1/PVA antes da eletrofição com o objetivo de fornecer um agente capaz criar ligações com as estruturas do colágeno, gerando uma coloração verde vistosa, o que demarcaria a sua presença.

### **4.6.4 Análise termogravimétrica (TGA)**

Com objetivo de avaliar a estabilidade térmica e a perda de massa dos filmes eletrofiados para as amostras de PCL com os solventes (90AC/AF, 70AC/AF, 70CLO/AC e 70DCM/DMF), foi realizado a varredura térmica usando o equipamento Shimadzu

TGA-50 do Laboratório Multiusuário de Caracterização de materiais do PEMM/COPPE/UFRJ). As análises foram realizadas na faixa de 25 – 700°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de N<sub>2</sub>.

#### 4.6.5 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

O comportamento térmico dos filmes eletrofiados e do polímero puro, foi avaliado pela análise de DSC, usando um equipamento Hitachi – DSC 7020 Thermal Analysis system do Laboratório de Catálises para Polimerização, Reciclagem e Polímeros Biodegradáveis (LCPRB) do Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano (IMA – UFRJ).

Nesta análise, usou-se aproximadamente 7 mg dos filmes obtidos após de 5 horas de eletrofiação com cada um dos solventes estudados. Foram realizados dois ciclos de aquecimento e um de resfriamento com taxa de 10°C/min e em atmosfera de nitrogênio com uma taxa de 50mL/min. O primeiro ciclo de aquecimento foi conduzido de 25°C até 90°C, seguido por um ciclo de resfriamento até 0°C e posterior aquecimento de 0°C a 90°C.

O grau de cristalinidade relativo do material ( $X_c$ ) foi calculado pela Equação 1:

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde  $\Delta H_f$  é a medida da entalpia de fusão que corresponde à área do pico endotérmico da curva de DSC no 2º aquecimento.  $\Delta H_f^0$  é a entalpia de fusão para uma amostra de PCL com grau de cristalinidade de 100% considerou-se  $\Delta H_f^0$  igual a 151,7 J/g (DULNIK *et al.*, 2016).

#### 4.6.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A composição química e estrutural dos filmes foi analisada por FTIR. Para a obtenção dos espectros foi utilizado o equipamento Spectrum 100 (Perkin-Elmer) do Laboratório multiusuário de caracterização de Materiais de PEMM/COPPE, usando cristal de ZnSe e refletância total atenuada (ATR). As análises foram conduzidas na faixa de 4000 – 550 cm<sup>-1</sup> com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 32 varreduras por amostra.

A avaliação da intensidade relativa da cristalinidade do PCL foi obtida por determinação das áreas dos espectros referentes a vibração das ligações C-O e C-C da fase cristalina ( $A_{1295\text{cm}^{-1}}$ ) e das vibrações e do grupo carboxila ( $A_{1724\text{cm}^{-1}}$ ) de acordo com a Equação 2.



$$\text{Intensidade relativa de cristalinidade do PCL} = \frac{A_{1295\text{cm}^{-1}}}{A_{1724\text{cm}^{-1}}} \quad (\text{Equação 2})$$

Para calcular a estimativa da estrutura tripla hélice característica do colágeno tipo I, foi avaliada usando o somatório das intensidades (área das bandas) referentes as amidas do colágeno nativo em relação com o somatório das amidas das fibras eletrofiadas de Col\_1/PVA, como é mostrado na Equação 3.

$$\% \text{ da tripla helice} = \frac{\Sigma(\text{Área das amidas})_{\text{Col nativo}}}{\Sigma(\text{Área da amidas})_{\text{fibras Col}_1/\text{PVA}}} \quad (\text{Equação 3})$$

#### 4.6.7 Análise de ângulo de contato

A avaliação do recobrimento das fibras do PCL com o Col\_1 produzidas por eletrofição coaxial foi realizada por meio da medida de ângulo de contato sob atmosfera de ar e a temperatura ambiente. Foi utilizado um goniômetro Ramé-Hart NRL A 100-00 do Laboratório de Superfícies Poliméricas e Asfálticas do PEMM/COPPE. Uma gota de água (2µL) foi depositada na superfície de uma amostra de 1 cm x 4 cm dos três filmes (PCL, COL\_1/PVA, filme coaxial). As medidas foram feitas em 3 pontos diferentes das amostras.

#### 4.6.8 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar média, a massa ponderal média e a polidispersão foram medidas usando equipamento Shimadzu LCSolution. Para a análise foram pesadas 2 mg de cada um dos filmes eletrofiados usando método de clorofórmio com um volume injetado aproximado de 2 µL.

#### 4.6.9 Viscosimetria

A viscosidade das soluções de PCL foram avaliadas usando viscosímetro do Brookfield do Laboratório de Macromoléculas e Coloides na Indústria do Petróleo (LMCP) do instituto de Macromoléculas Eloisa Mano IMA/UFRJ. Usando temperatura de 25°C e Spindle de 25 a 60 rpm.

#### 4.6.10 Condutividade Elétrica.

Com o objetivo de avaliar a condutividade elétrica das soluções e a sua influência no processo de eletrofição, foi utilizado Condutivímetro Digimed DM-32 do Laboratório

de Eletroquímica Aplicada (LEA) do PEMM/COPPE/UFRJ, utilizando eletrodo DMc – 100M, K: 10 cm<sup>-1</sup>, a sonda foi colocada em 30 mL das 4 soluções de PCL obtidas.

#### 4.6.11 Ensaios de degradação *in vitro* do filme coaxial.

A degradação “*in vitro*” dos filmes contendo fibras coaxiais foi avaliada por meio da liberação de colágeno em soro fisiológico. Três amostras do filme foram cortadas, pesadas e colocadas em 20 mL de soro fisiológico a 37°C por 672 horas. Foram tomadas 8 alíquotas de 2 mL da solução para cada uma das amostras nesta faixa de tempo. Foi retirado o volume da amostra e colocada a mesma quantidade do soro extraído com o propósito de manter o volume constante.

A análise de liberação foi realizada usando o Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific) para detecção de proteína. As medidas do colágeno foram realizadas usando espectrofotômetro de UV – Vis (Pekin Elmer) Lambda 25 do Laboratório de Biopolímeros e de Bioengenharia do PEMM/COPPE, usando para a medida comprimento de onda de 562 nm. A quantidade de colágeno liberado, foi determinada utilizando a Equação 4.

$$\text{Liberação COL 1} = \left( \frac{V_o}{V_o - V_{Aliq}} \right)^{n-1} \quad (\text{Equação 4})$$

Na qual V<sub>O</sub> é o volume inicial usado na análise (20 ml) e o V<sub>Aliq</sub> é o volume da alíquota usada nos ensaios (2 ml), n o número de amostras usadas (DA SILVA *et al.*, 2016).

#### 4.6.12 Grau de intumescimento

Para avaliar a capacidade que possui o filme com estrutura Núcleo – Casca para adsorver líquidos, foi realizado ensaio de intumescimento. Foram cortadas e pesadas 3 amostras do filme obtido por eletrofiação coaxial de PCL – Col\_1/PVA e colocadas em 20 mL de soro fisiológico a 37°C por 29 dias. As amostras foram tiradas do meio secadas com papel filtro e pesadas nos tempos de 0,5, 2, 24 horas, 2 dias, 7 dias e 29 dias. O grau de intumescimento (GI) foi calculado usando a equação 5.

$$GI = 100 \times \frac{W_s - W_D}{W_D} \quad (\text{Equação 5})$$

Na qual o W<sub>s</sub> é a massa da amostra inchada para cada intervalo de tempo e W<sub>D</sub> é a massa da amostra seca inicial.

#### **4.6.13 Ensaios *in vitro* de citotoxicidade**

Para avaliar a citotoxicidade dos filmes compostos por fibras núcleo – casca foram avaliados 2 filmes produzidos com as melhores condições de eletrofiação coaxial (MAT1 e MAT2). Um filme com o dobro das vazões usadas mantendo a relação entre elas (vazão da casca / vazão do núcleo) (MAT 4) e uma amostra do filme onde não se obteve formação de fibras núcleo – casca (MAT3).

##### **4.6.13.1 - Cultura de células.**

Para o análises de cultura celular foram usados fibroblastos L929 com baixo crescimento DMEM em meio de cultura RPMI 1640, suplementado como 10% de FBS. Para a viabilidade do ensaio celular foi usado MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromida adquirida da Sigma Chem. Co., Saint Louis, MO, USA); kit colorimétrico comercial no radiativo para Citotoxicidade LDH (Promega, Madison, WI, USA); e DMSO (Sigma Aldrich (USA)). A línea celular foi cultivada a 37°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub>.

##### **4.6.13.2 Ensaio MTT.**

A viabilidade celular para diferentes concentração de células foi avaliada por método colorimétrico. As células NCTC clone 929 foram semeadas e estudas após de serem expostas por 24 horas ao material. Após, as células foram lavadas duas vezes com 100 µl de PBS. O meio adicionado o meio completo contendo 0,15 mg/ml de MTT, para posteriormente as células serem incubadas por 3 horas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi descartado e as células foram homogenizadas com 100 µl de DMSO para lise celular e solubilização da formazan gerada.

## CAPITULO V

### 5 ANÁLISE DE RESULTADOS

#### 5.1 Eletrofiação monolítica de PCL

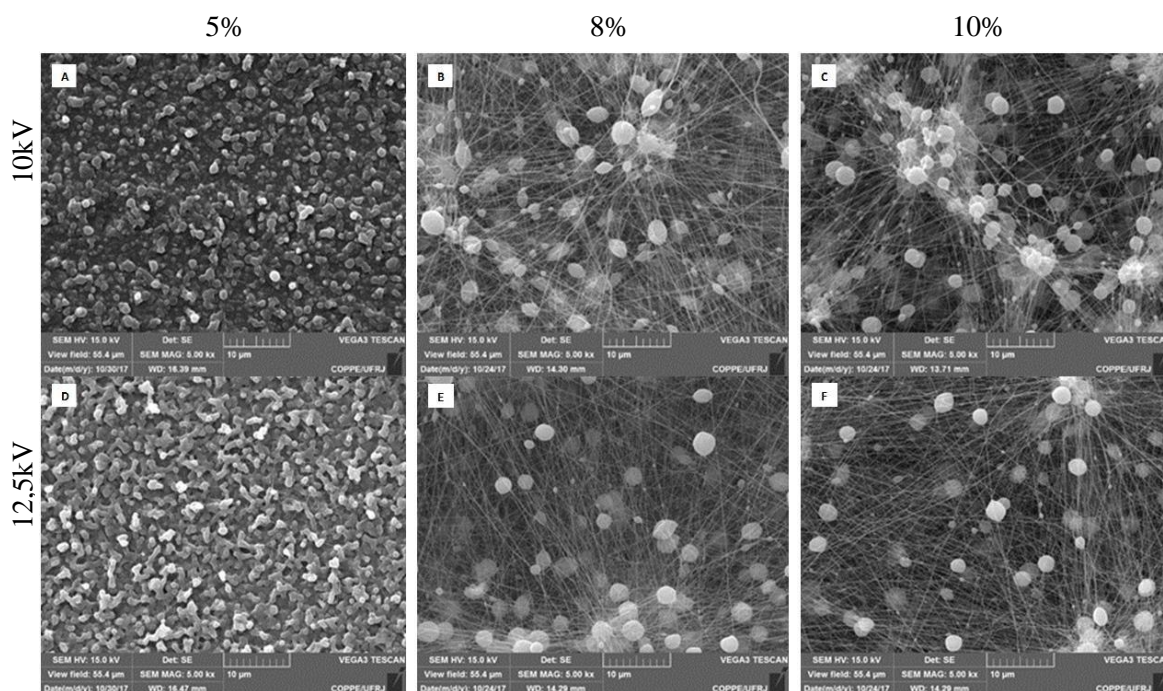
Uma das variáveis com maior influência no processo de eletrofiação é a concentração do polímero na solução, que pode ser relacionada diretamente com sua viscosidade. Sendo estas variáveis as que proporcionam mudanças significativas nas diversas condições de processamento, entre elas: a vazão e a voltagem, que em conjunto promovem à disponibilidade do polímero na ponta da agulha que posteriormente formará a fibras. Se a viscosidade da solução é muito baixa não será possível a formação de fibras contínuas, criando um alto número de defeitos. Por outro lado, se a viscosidade é muito alta, a solução polimérica solidificará na ponta da agulha, criando uma obstrução na saída do material polimérico, como foi descrito por CERBINO *et al.*, em 2013. Tendo isto em mente, começou-se este trabalho, avaliando a melhor concentração para eletrofiar o PCL, usando quatro sistemas de solventes reportados na literatura. Inicialmente foi estudada a concentração do PCL numa solução composta por AC:AF com relação volumétrica de 9:1. Os parâmetros utilizados são descritos na Tabela 4, as micrografias obtidas com a variação destas variáveis são mostradas na Figura 15.

**Tabela 4.** Condições iniciais de eletrofiação do PCL com 90AC/AF.

Concentração (%)	Distância (cm)	Voltagem (kV)	Vazão (ml/h)
5	10	10; 12,5	0,5
8	10	10; 12,5	0,5
10	10	10; 12,5	0,5

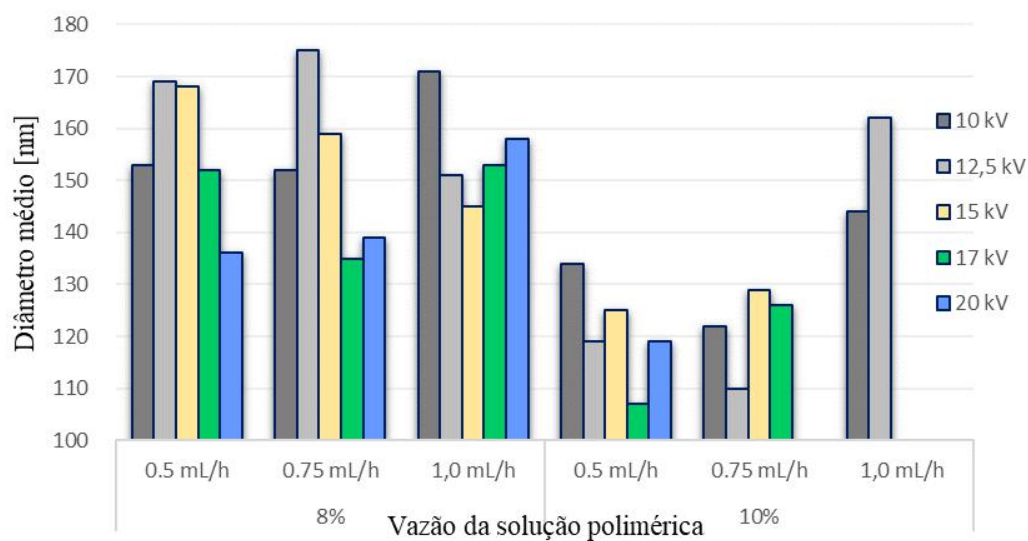
Pelas micrografias obtidas por MEV mostradas na Figura 15, observou-se que a eletrofiação com a solução de 5% (p/v) de PCL não ocorreu a formação de fibra para nenhuma das voltagens utilizadas (10 e 12,5 kV), e sim a formação de contas com diâmetro médio de 3,8  $\mu\text{m}$  através de toda a amostra analisada. Segundo a literatura, isto pode ser atribuído a uma baixa concentração, o que gerou baixa viscosidade da solução (LIVERANI e BOCCACCINI, 2016). No entanto, para as amostras com 8 e 10 %p/v, observou-se formação de fibras com diâmetro na escala sub micrométrica, porém um alto

conteúdo de contas. Por este motivo, decidiu-se realizar um estudo mais detalhado para o sistema 90AC/AF para as soluções com concentração de 8 e 10% p/v de PCL.



**Figura 15.** Influência da concentração de PCL na morfologia. Voltagem de 10 kV. {A) 5%, B) 8%, C) 10%}. Para voltagem de 12,5 kV. {D) 5%, E) 8%, F) 10% }.

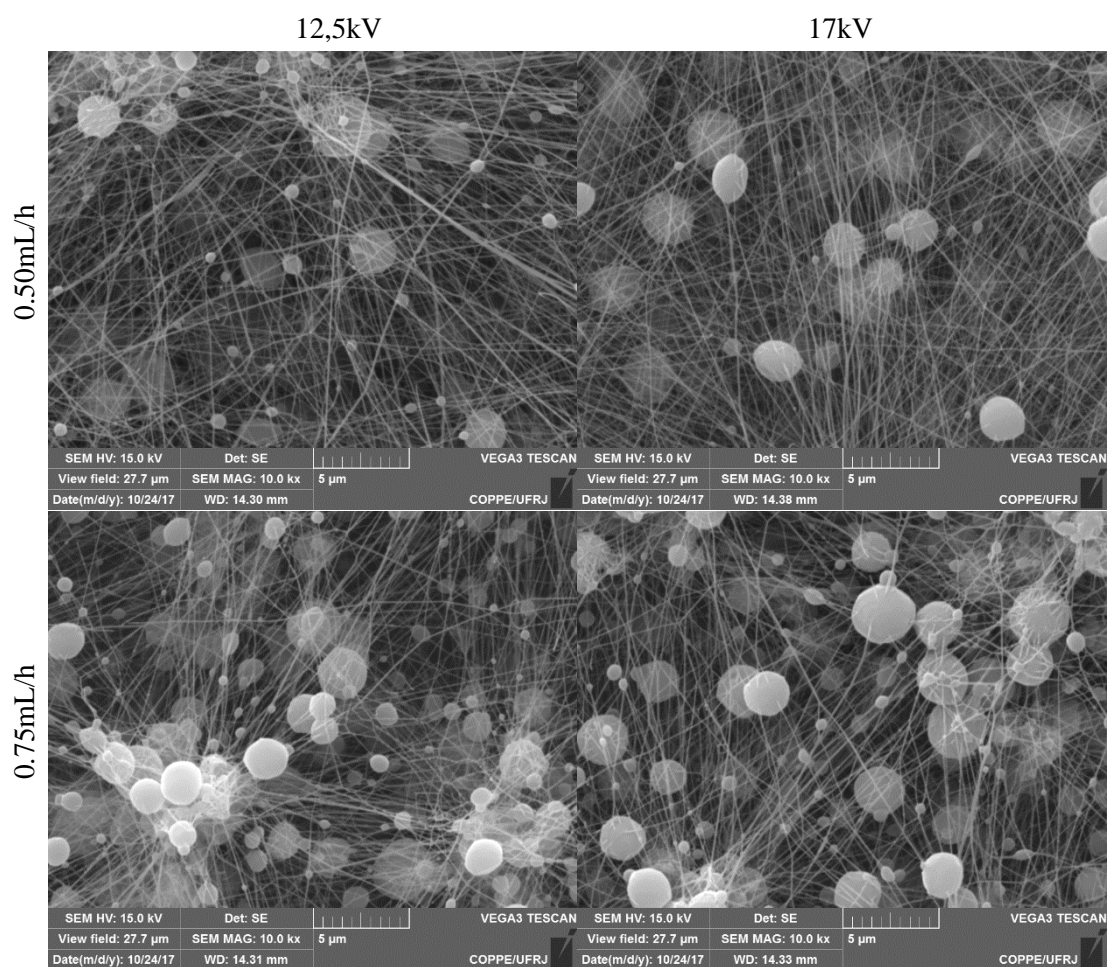
As soluções de 8 e 10 %p/v PCL produzidas com o sistema de solventes AC:AF e relação volumétrica 9:1 foram denominadas com os códigos: 08\_90AC/AF e 10\_90AC/AF, respectivamente. Foi realizado um estudo da influência da vazão, da voltagem e da concentração do PCL (8 e 10%) no processo de eletrospiação, onde a morfologia das fibras geradas foram avaliadas usando MEV. Os resultados são representados na Figura 16.



**Figura 16.** Relação dos parâmetros Vs diâmetro das fibras para uma solução de PCL 10 % em P/V.

Como observado na Figura 16., os menores diâmetros foram obtidos para a concentração de 10% p/v de PCL. Além disso, pode-se observar uma diminuição significativa no diâmetro com uma vazão de 0,5 mL/h e uma voltagem de 17 kV, com o qual foram obtidas as fibras com menor diâmetro ( $107 \text{ nm} \pm 363$ ). Por outro lado, observou-se que com o aumento da voltagem são obtidos diâmetros menores, o que é concordante com o reportado por CERVINO *et al.*, (2013), que atribuiu a diminuição dos diâmetros ao aumento das cargas na solução polimérica, fazendo com que as forças de atração superem com maior facilidade a tenção superficial da gota localizada na ponta da agulha, promovendo a formação do jato e a evaporação rápida dos solventes (HAIDER *et al.*, 2015).

Utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e o software *Size Meter*, avaliou-se o diâmetro das fibras, que apresentaram uma diminuição do tamanho médio de  $134 \text{ nm} (\pm 391)$  para  $107 \text{ nm} (\pm 363 \text{ nm})$  com o aumento da voltagem de 10 para 17 kV. No entanto, também foi observada a formação de contas nas fibras eletrofiadas para o sistema de solvente 90AC/AF, como é mostrado na Figura 17.



**Figura 17.** Imagem de MEV (x10.0 kx) para as fibras eletrofiadas de PCL10\_90AC/AF com varrições na Vazão (0,5 mL/h; 0,75 mL/h) e na voltagem aplicada (12,5 kV; 17 kV).

Observou-se (Figura 17) que a variação da voltagem exerce efeito sobre a morfologia das fibras, demonstrando que com o incremento de 12,5 kV para 17 kV, foi possível não só diminuir o diâmetro das fibras, mas também diminuir a presença de contas nas amostras obtidas com vazão de 0,5 mL/h. A amostra analisada mostrou formação de contas com tamanho não uniformes atribuído à instabilidade no cone de Taylor, relacionado possivelmente com uma diminuição da massa molar do PCL, devido ao processo de hidrólise que são favorecidos pela natureza ácida dos solventes utilizados (GIL-CASTELL *et al.*, 2017). Além de que pode também apresentar menores emaranhamentos nas cadeias poliméricas atribuídas à massa molar menor.

A influência da vazão e da voltagem na morfologia das fibras produzidas foram estudadas para cada sistema de solventes utilizados neste trabalho, usando concentração de 10% de PCL. As imagens de MEV obtidas são mostradas nas Figura 18. e Figura 19. considerando os quatro sistemas de solventes, para avaliar a influência da voltagem no

processo de eletrofiação, fixou-se uma vazão de 0,5 mL/h, variando a voltagem (15, 17 e 20 kV) (Figura 18).

Observa-se que a morfologia das fibras obtidas com o sistema 70DCM/DMF, apresentou-se como fibras contínuas, livres de contas e/ou defeitos. Além disso, observou-se que para as voltagens de 15, 17 e 20 kV os diâmetros das fibras foram de 608 nm ( $\pm 227,8$  nm), 445.2 nm ( $\pm 166,7$  nm) e 344.7 nm ( $\pm 68$  nm), respectivamente. Isso indica que o aumento da voltagem é inversamente proporcional ao diâmetro gerado, o que é concordante com o reportado por HAIDER, *et al.*, 2017, onde é relatado a diminuição do diâmetro da fibra com o aumento da voltagem. Este comportamento é atribuído ao alongamento da solução devido as forças de repulsão das cargas dentro do jato polimérico.

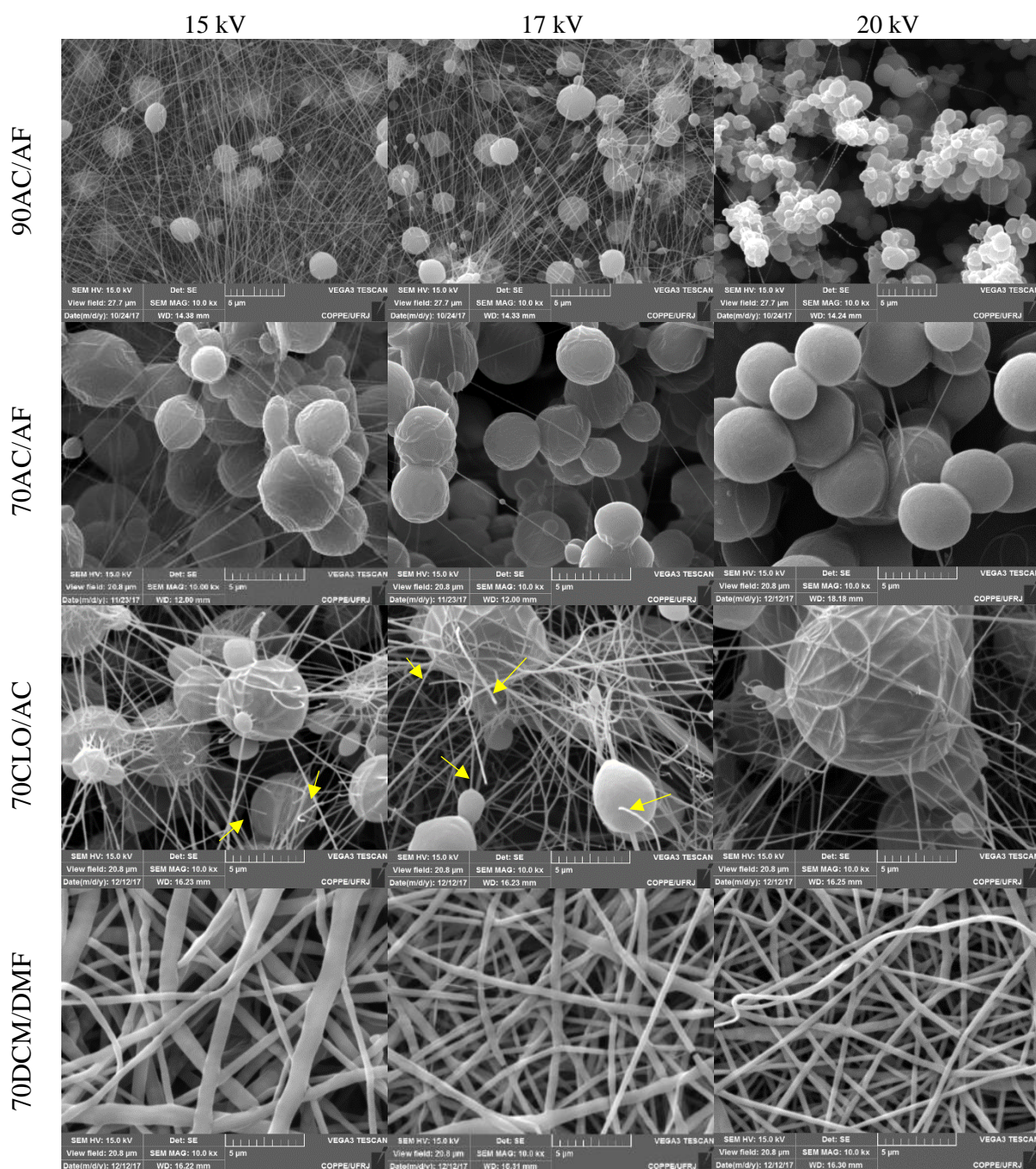
Na Figura 18. , foram feitos registros para as outras três soluções (90AC/AF, 70AC/AF e CLO/AC). Foram obtidas fibras homogêneas com grande número de defeitos nas condições trabalhadas. Esta variação na morfologia foi estudada fazendo referência à influência dos solventes utilizados. Observa-se que as amostras eletrofiadas usando AC/AF como solvente (90AC/AF e 70AC/AF) geraram fibras finas, na escala nanométrica. No entanto, apresentaram grande quantidade de contas, as quais foram aumentando em tamanho e número com o incremento da voltagem. Esse comportamento pode ser atribuído à alta condutividade da solução, que promove a formação de contas, tornando o processamento de eletrofiação similar ao processo conhecido como “*electrospray*”.

Esse resultado está de acordo com os resultados reportado por ENIS *et al.*, que em 2016 relataram que o AF, por ser um ácido com alto poder iônico, possui alta condutividade elétrica, o que também pode ser verificado neste trabalho, conforme os valores registrados na Tabela 6. A tabela mostra que o aumento da concentração do AF de 10% para 30% em volume, gerou um incremento aproximado de 17 vezes da condutividade elétrica para o sistema AC/AF. Esse fato também pode ser corroborado na Figura 18, considerando o sistema de solventes AC/AF, nos mesmos valores de vazão e voltagem; com o aumento da quantidade de AF na solução, foi obtida maior homogeneidade no diâmetro das contas, além do seu aumento, e o desaparecimento das fibras quase que por completo para as voltagens de 17 e 20 kV.

O solvente bicomponente CLO/AC também foi avaliado no processo de eletrofiação. Este estudo foi realizado para avaliar a influência da incorporação do AC em CLO e mostrou que se criou uma desestabilização no cone de Taylor, devido ao



aumento da condutividade elétrica na solução. Tal efeito pode ter possivelmente contribuído para a formação de micro contas como é mostrado na Figura 18. Com o incremento da voltagem (17 kV e 20 kV), observou-se a formação de fibras curtas, assim como também um aumento no tamanho das contas (3,91  $\mu\text{m}$ ). Isso pode ter ocorrido devido à instabilidade própria do jato produzida por excesso de cargas relacionadas com a voltagem mais alta, como relatado por HUANG *et al.* (2015).

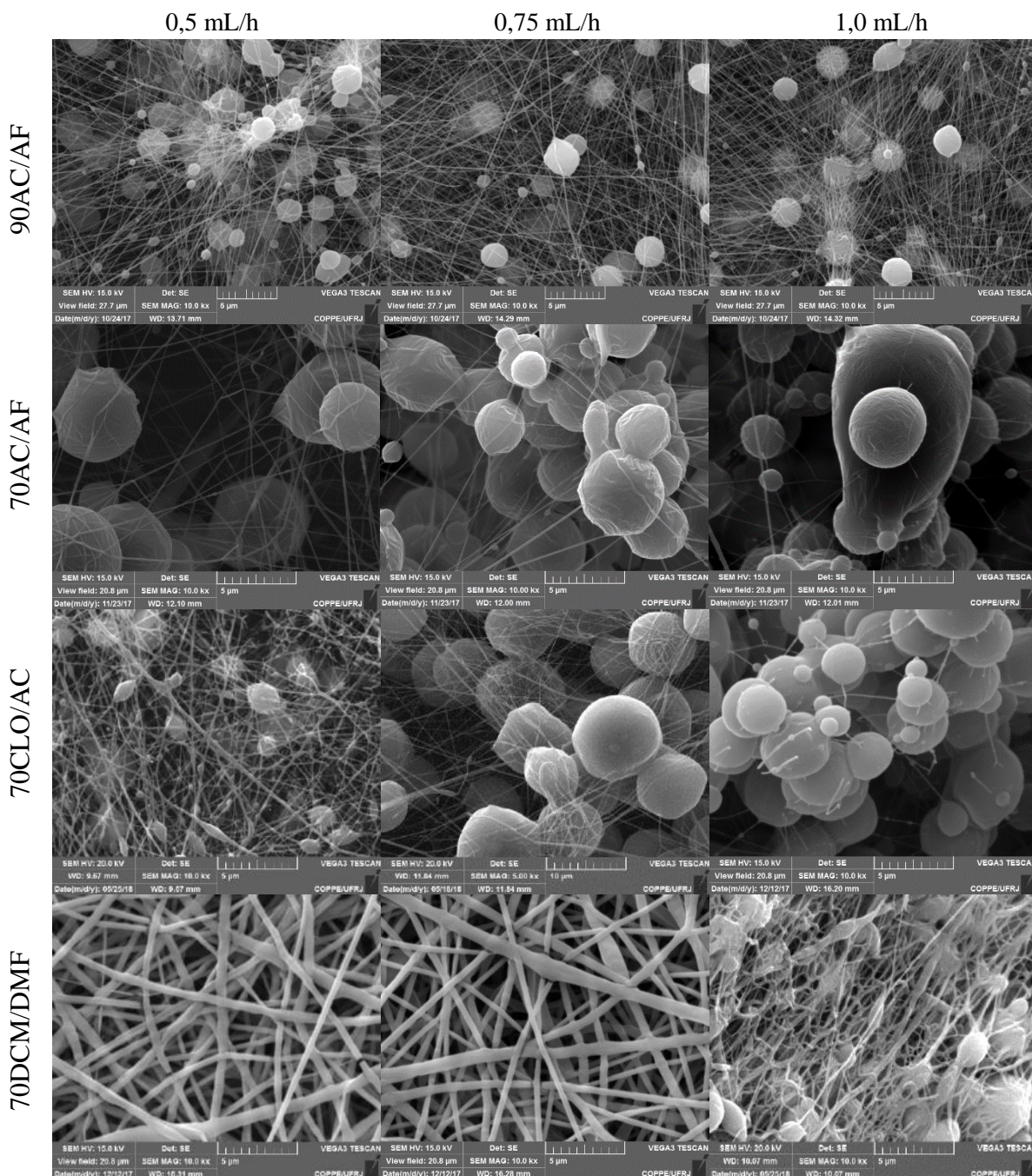


**Figura 18.** Imagens de MEV mostrando a influência da voltagem em função do solvente na morfologia das fibras de PCL.



### 5.1.1 Influência da vazão na eletrofição do PCL

Segundo a literatura, a vazão tem significativa influência na morfologia das nanoestruturas obtidas por eletrofição, usando iguais condições de operação (voltagem, distância percorrida e concentração). A Figura 19 mostra imagens de MEV obtidas em três diferentes vazões (0,5 mL/h, 0,75 mL/h, 1,0 mL/h), em função dos solventes usados no processo de eletrofição, tomando uma voltagem fixa de 17 kV.



**Figura 19.** Imagens de MEV mostrando a influência da vazão na morfologia das fibras de PCL eletrofiadas segundo o sistema de solvente. Voltagem: 17 kV, distância percorrida: 15 cm e concentração: 10% (p/v).

Finalmente, as fibras obtidas foram caracterizadas realizando a medição dos diâmetros para cada um dos quatro sistemas de solventes e também realizando avaliação qualitativa das fibras, levando em consideração características como os menores diâmetros, maior uniformidade das fibras, assim como a menor quantidade de defeitos (contas e/ou bolas). Os resultados são reportados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros para eletrofiação do PCL em função do tipo de solvente

SOLVENTE	VAZÃO (ml/h)	VOLTAGEM (kV)
AC/AF (9:1)	0,75	15
AC/AF (7:3)	0,50	17
CLO/AC	0,50	20
DMF/DCM	0,50	17

### 5.1.2 Efeito do solvente no processo de eletrofiação de PCL

Conforme já mencionado neste trabalho, o processo de eletrofiação é uma técnica usada para produção de fibras poliméricas com diâmetros na escala sub micrométrica. No entanto, em 2013, KHAJAV *et al.*, descreveram que a morfologia das fibras fiadas é altamente influenciada e limitada não só por fatores relacionados ao processamento, mas também pelas variáveis relacionadas à solução utilizada. Fatores como a viscosidade, a tensão superficial, a condutividade, a massa molar do polímero entre outros, influenciam diretamente na produção de fibras contínuas com diâmetros uniformes. Por este motivo, foi estudada na primeira fase deste trabalho, a influência dos solventes no processo de eletrofiação monolítica da policaprolactona (PCL).

Para este estudo foi realizada caracterização das soluções, realizando medição da viscosidade e condutividade elétrica para cada uma das quatro soluções avaliadas usando concentração fixa de 10% p/v de PCL. Os dados medidos são apresentados na Tabela 6 e serviu para mostrar as variações da viscosidade e condutividade nesses sistema de solventes com base nos resultados discutidos anteriormente, que podem ter influência direta na morfologia das fibras eletrofiadas.

**Tabela 6.** Viscosidade e condutividade das soluções de PCL.

Variável	90AC/AF	70AC/AF	70CLO/AC	70DMF/DCM
Viscosidade (cP)	57,60	19,20	105,60	28,80
Condutividade (μS/cm)	3,45	58,97	-	116,70

A relação que apresenta polímero – solvente gera condições especiais na solução de forma que o emaranhamento das cadeias poliméricas gere variações na viscosidade como

é observada na Tabela 6, onde é mostrada que a maior afinidade solvente – PCL foi apresentado com o sistema de 70 CLO/AC, mostrando um valor da viscosidade elevada em comparação com os outros sistemas de solventes utilizados. Porém, o sistema que gerou a morfologia desejada apresentou baixa viscosidade (28,8 cP) e uma alta condutividade condições importantes na eletrofiação o que mostra condições estáveis das cadeias poliméricas no processo para a formação do cine de Taylor.

Por outro lado, obteve-se viscosidade baixa nas soluções obtidas usando AC como solvente, porém, como tem sido repostado nesta dissertação o caráter ácido dos solventes poderia estar ligada nesta diminuição significativa da viscosidade atribuída a uma possível quebra da cadeia do PCL, para analisar se o polímero apresenta dita degradação, foi realizada avaliação da massa molar dos filmes fiados usando estas quatro soluções já descritas anteriormente.

### 5.1.3 Avaliação da massa molar do PCL eletrofiado

Como tem sido registrado neste trabalho, as propriedades químicas dos solventes mostraram influência significativa na morfologia das fibras e/ou estruturas produzidas por eletrofiação, já que estes interferem nas variáveis do processo, conforme as propriedades da solução como viscosidade e condutividade, para soluções com a mesma concentração polimérica.

Com o objetivo de avaliar a influência dos solventes sobre a massa molar das fibras eletrofiadas de PCL, as fibras foram analisadas por cromatografia de permeação em gel (GPC). Os resultados de massa molar numérica média ( $M_n$ ), massa molar ponderal média ( $M_w$ ) e polidispersão ( $M_w/M_n$ ) do PCL após da eletrofiação e seu comparativo com o PCL que não foi submetido ao processo de eletrofiação são mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7.**  $M_w$ ,  $M_n$  e  $M_w/M_n$  do PCL medida por GPC antes (PCL) e após da eletrofiação em diferentes sistemas de solventes.

	PCL	90AC/AF	70AC/AF	70CLO/AC	70DCM/DMF
$M_w$	229.100	41.500	143.400	201.300	55.600
$M_n$	141.000	24.100	76.600	118.000	33.400
$M_w/M_n$	1,63	1,72	1,87	1,71	1,67

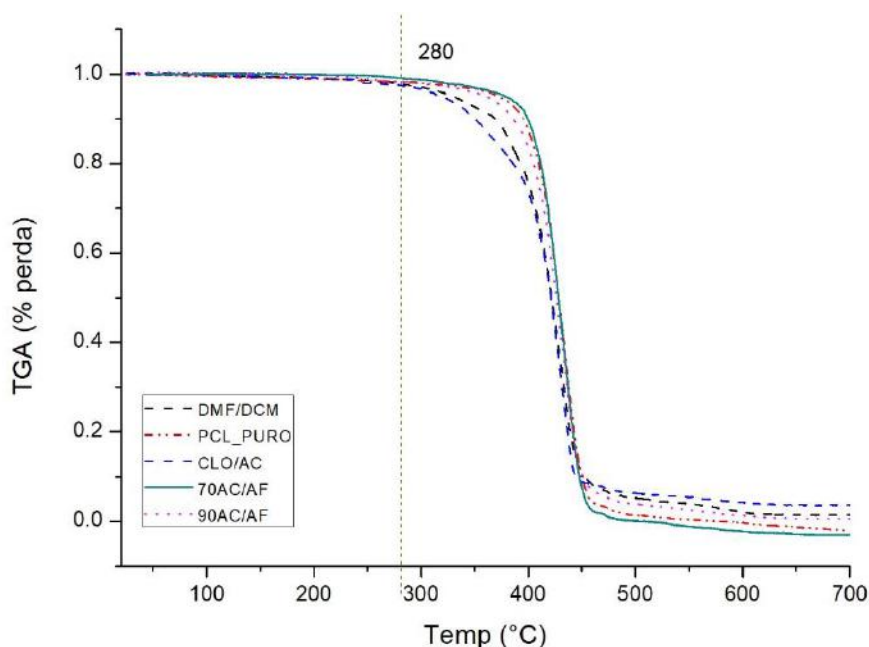
De acordo com as micrografias registradas na Figura 19. , ocorreu a formação de fibras longas e livres de contas usando o sistema solvente DCM/DMF, que mostrou uma diminuição de  $M_w$  próxima de 75,7% (de 229.100 para 55.600 g/mol), após a eletrofiação.

A redução de  $M_w$  em conjunto com a viscosidade da solução (28,8 cP) forneceram as condições necessárias para a geração de fibras contínuas com diâmetros uniformes e livres de contas e/ou defeitos. Além disso, observou-se uma diminuição evidente da massa molar do PCL quando este é solubilizado num solvente orgânico polar como o ácido acético, atribuída principalmente à quebra das ligações éster no PCL pela ação do ácido. A diminuição da concentração do AC no sistema solvente gerou cadeias mais longas de PCL após da eletrofiação, aumentando  $M_w$  de 41.500 para 143.400 g/mol quando a concentração de AC passou de 90 a 70%, respetivamente.

A diminuição da massa molar parece ter tido uma relação direta com a viscosidade como era de esperar. As soluções com maiores viscosidades resultaram em polímeros com maior  $M_w$ , o que é concordante com os resultados de viscosidade apresentados na Tabela 6.

#### 5.1.4 Comportamento térmico dos filmes

Para avaliar o comportamento térmico dos filmes obtidos, avaliou-se as perdas de massa dos quatro filmes eletrofiados por análise termogravimétrica (TGA), comparando-os com o PCL em pellets usado neste trabalho. Os resultados são apresentados na Figura 20.



**Figura 20.** Curvas de TGA de PCL e de filmes eletrofiados de PCL

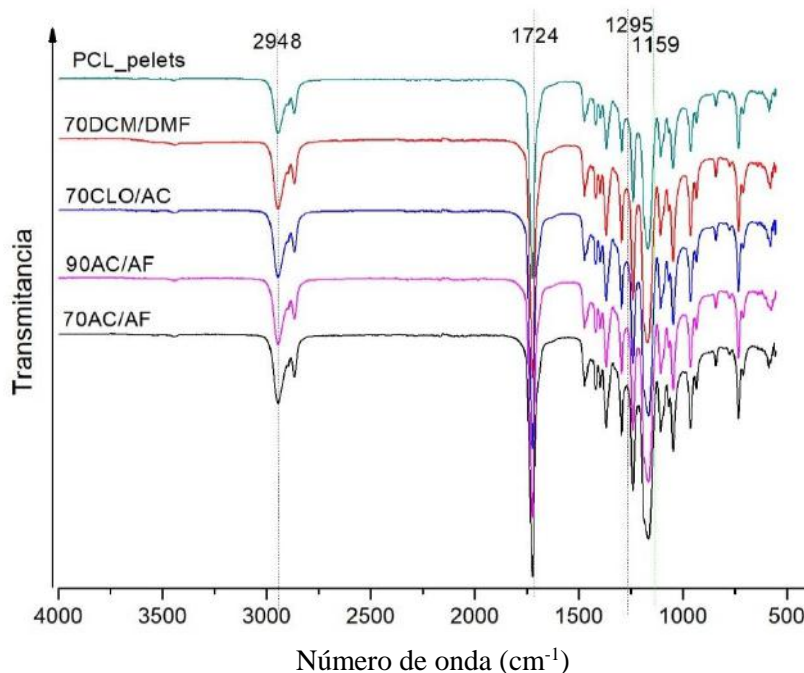
Como mostra a Figura 20, a degradação ocorre como um só evento de perda de massa, atribuída à decomposição do PCL na faixa de 382 a 409°C, como relatado por



GONÇALVES em 2015. Por outro lado, não foram observadas perdas significativas de massa em temperaturas inferiores aos 320°C, faixa onde os solventes usados apresentam temperaturas de evaporação. Pode-se concluir que os solventes usados nas soluções eletrofiadas foram evaporados por completo no processo de eletrofiação. Para comprovar se existe traço dos solventes que não foram detectadas no TGA, foi realizado como análise complementar a espectroscopia no infravermelho, apresentada na próxima seção.

### 5.1.5 Análise estrutural dos filmes de PCL

Na Figura 21 são apresentados os espectros no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para o PCL, onde são mostradas as bandas características para este polímero, assim como o comparativo delas para as amostras obtidas por eletrofiação com os quatro sistemas de solventes utilizados.



**Figura 21.** Espectros de FTIR-ATR para PCL e fibras eletrofiadas a partir dos diferentes sistemas solvante

Segundo o reportado por ELZEIN *et al.* (2004), é possível identificar com facilidade no espectro do PCL a banda de absorção referente ao estiramento do grupo carbonila (C=O) em número de onda de aproximadamente 1750 cm<sup>-1</sup>. As outras bandas significativas para o PCL são apresentadas na Tabela 8.

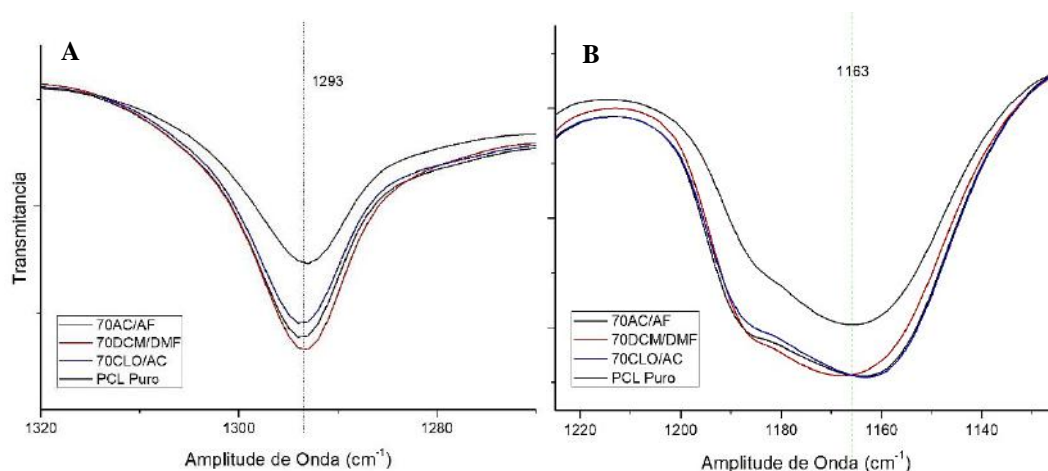
Por outro lado, as bandas de absorção observadas são características para o PCL (Figura 21). Não foram encontradas bandas referentes aos solventes usados no processo de eletrofiação, sendo possível afirmar que, se presentes, os solventes estão em muito

baixa quantidade nas fibras, tendo sido evaporados quase por completo durante o processamento de eletrofiação.

**Tabela 8.** Bandas de absorção características no infravermelho para o PCL (ELZEIN *et al.*)

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		Tipo de absorção
Literatura	Experimental	
2949	2948	Vibrações assimétricas do CH <sub>2</sub>
2865	2861	Vibrações simétricas do CH <sub>2</sub>
1727	1724	Vibrações do grupo carboxila (C=O)
1293	1295	Vibração das ligações C–O e C–C da fase cristalina
1240	1239	Vibrações assimétricas do grupo COC
1190	1187	Vibrações do OC–O
1170	1173	Vibrações simétricas do COC
1157	1159	Vibrações das ligações C–O e C–C da fase amorfa

A cristalinidade do PCL também pode ser avaliada usando os espectros no infravermelho (FTIR), já que em amostras cristalinas aparece uma banda referente as vibrações da fase cristalina do PCL, como foi descrito por ELZEIN *et al.* (2004). Conforme relatam os autores, a banda de absorção próxima a 1293 cm<sup>-1</sup> é atribuída ao estiramento das ligações C-O e C-C na fase cristalina do PCL. A maior banda observada nos espectros encontra-se em 1727 cm<sup>-1</sup> e é atribuído as vibrações do grupo carbonila (C=O) do PCL. Para avaliar variações na cristalinidade geradas pelos solventes, foi realizada a análise da variação na área da banda relacionada à fase cristalina (1293 cm<sup>-1</sup>), como é mostrado na Figura 22. A área desta banda foi normalizada e registradas na Tabela 9.



**Figura 22.** Comparativo da cristalinidade por FTIR – ATR para o PCL. A) banda na fase cristalina, B) banda na fase amorfa.

**Tabela 9.** Variações da cristalinidade segundo a área na banda cristalina para PCL.

<b>Solvente</b>	<b>Fase cristalina</b>	<b>Fase amorfa</b>
PCL <i>Pellets</i>	0,39	0,82
90AC/AF	0,43	0,56
70AC/AF	0,60	0,57
70CLO/AC	0,45	0,58
70DCM/DMF	0,35	0,61

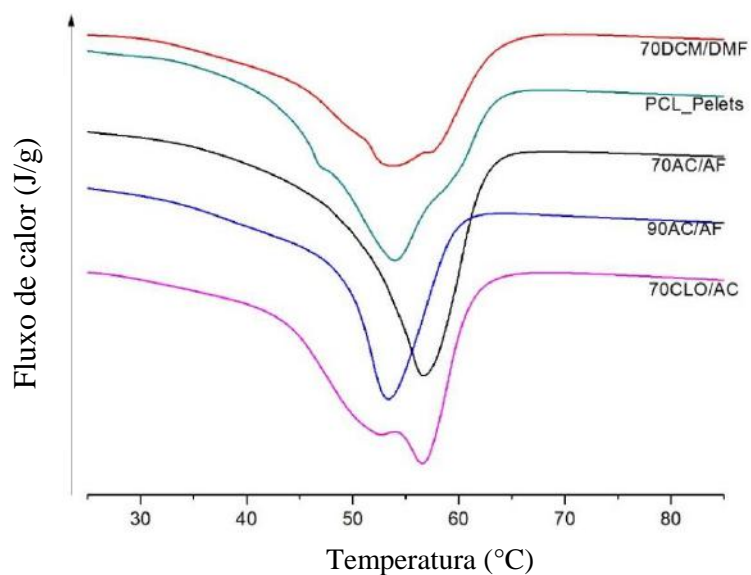
Foram avaliadas as bandas da fase cristalinidade e da fase amorfa, as quais foram normalizadas usando a intensidade da banda referente as vibrações do grupo carbonila e registradas na Tabela 9. É possível notar que a intensidade da banda relacionada à fase cristalina apresentou diminuição significativa da intensidade após do processo de eletrofição, quando comparada com a intensidade do PCL em pellets. Essa diminuição da intensidade da banda foi atribuída à rápida solidificação do polímero e ao alongamento das fibras e estiramento das cadeias, ao serem submetidas ao campo elétrico. Isso faz com que não sejam geradas condições para que as cadeias poliméricas se organizem na forma de cristais, gerando uma cristalinidade menor que aquela observada nos pellets.

#### **5.1.6 Transições térmicas e cristalinidade das fibras de PCL**

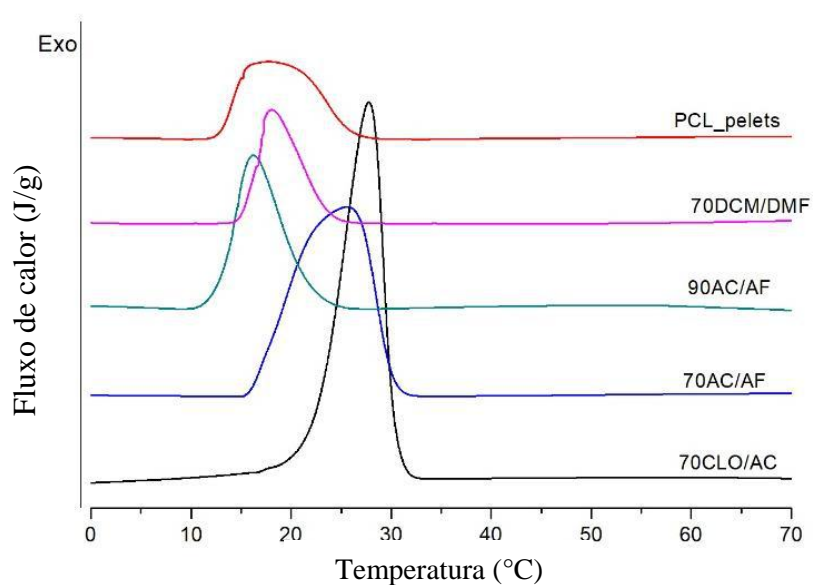
As transições térmicas e a cristalinidade dos filmes de PCL foram avaliadas usando calorimetria exploratório diferencial (DSC). As amostras foram eletrofiadas usando cada um dos sistemas de solventes estudados nesta fase da dissertação, analisando o primeiro ciclo de aquecimento (Figura 23) com o objetivo de avaliar a influência do processamento na cristalinidade das fibras. Também foram estudadas as transições térmicas do PCL para um ciclo de resfriamento (Figura 24) e após o segundo aquecimento (Figura 25). As transições térmicas e grau de cristalinidade dos filmes são apresentados na

Tabela 10.

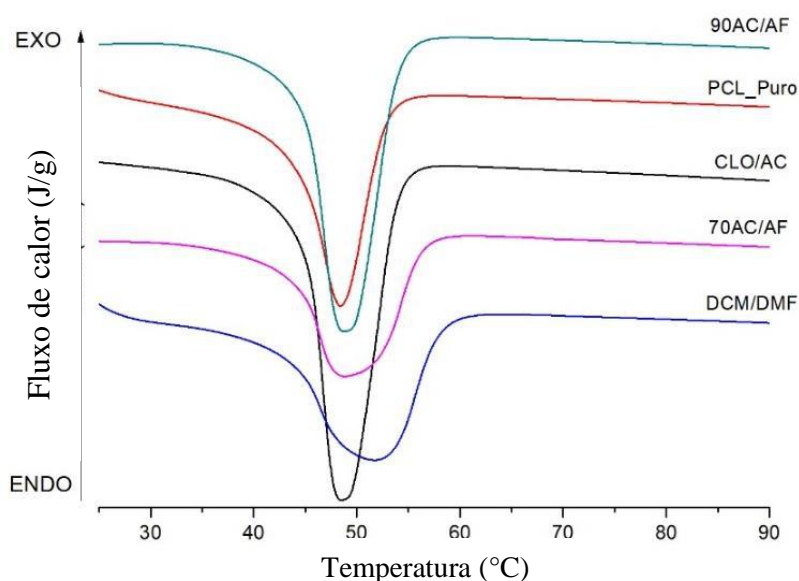




**Figura 23.** Curvas de DSC do primeiro ciclo de aquecimento a 10°C/min para o PCL 10% p/v, para cada um dos sistemas solvente.



**Figura 24.** Curvas de DSC do ciclo de resfriamento para o PCL usando taxa de 10°C/min, para cada um dos sistemas solvente.



**Figura 25.** Curvas de DSC (segundo aquecimento) para o PCL para os filmes de PCL obtidos a partir de cada um dos sistemas solvente.

**Tabela 10.** Transições térmicas referentes aos ciclos de aquecimento e resfriamento do PCL para os diferentes sistemas de solventes.

Amostra	1º aquecimento		Resfriamento		2º aquecimento		$X_c$ (%)
	$T_{f-1}$ (°C)	$\Delta H_{f-1}$ (J/g)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_{f-2}$ (°C)	$\Delta H_{f-2}$ (°C)	
PCL_pellets	54	23,1	18	21.2	48	13,8	15,2
90AC/AF	53	19,1	16	17.4	49	13,0	12,6
70AC/AF	57	22,0	26	20.2	49	18,9	14,5
70CLO/AC	57	20,6	28	23.0	48	25,0	13,6
70DCM/DMF	54	19,6	18	17.9	52	15,2	12,9

Na Figura 23 mostra que todas as fibras de PCL apresentam pico endotérmico atribuído à fusão cristalina, e que as fibras preparadas com o sistema de solventes AC/AF apresentaram a menor distribuição de tamanho dos cristais, comprovada pelo pico de fusão mais estreito e mais intenso.

No primeiro aquecimento, observa-se que o pico de fusão  $T_{f-1}$  para o PCL (*pellets*) mostra diferenças na fusão de seus cristais, apresentando pico alargado e com possibilidade da presença de três cristais de diferentes faixas de fusão. Os picos de fusão gerados para as fibras obtidas com solventes de 90AC/AF e 70AC/AF são mais estreitos, sugerindo que o processo de eletrofiação produziu cristais mais homogêneos. Esta diferença pode estar relacionada com a diminuição da massa molar do PCL ocorrida durante o processo o que daria maior liberdade de movimento as cadeias poliméricas. No

entanto, é observado um deslocamento do pico de fusão de 53°C para 57°C com o aumento do AC na solução de solvente.

As estruturas geradas usando o sistema de solvente 70CLO/AC gerou pico bimodal, sugerindo a presença de dois tipos de cristais com perfeição cristalina diferentes. Conforme visto por MEV, as melhores fibras foram obtidas usando o sistema de solventes 70DCM/DMF. Entretanto, estas fibras apresentaram a menor cristalinidade, que pode ser atribuído ao processo de estiramento do material, quando pode ter ocorrido alta razão de evaporação dos solventes, o que faz com que os cristais não consigam se formar adequadamente, gerando um material com alto teor de fase amorfa.

A cristalização dos polímeros eletrofiados nos quatro solventes foi estudada no estágio de resfriamento entre 100°C e 0°C. Observou-se um deslocamento da temperatura de cristalização ( $T_c$ ) de 18°C para o PCL em pellets para 28°C para o PCL que havia sido eletrofiado na solução de 70AC/AF. Este deslocamento da  $T_c$  está relacionado principalmente com as variações da massa molar do polímero durante a eletrofiação, o que é concordante com o registrado por GIL-CASTELLI *et al.* (2017) e por SPERANZA *et al.* (2014).

## **5.2 Eletrofiação monolítica de Colágeno I/PVA**

O colágeno é uma macromolécula natural presente na maioria dos tecidos do corpo, o que o tornou uma alternativa promissora na formulação de biomateriais fibrosos altamente biocompatíveis. Porém estes biomateriais apresentaram baixas propriedades mecânicas em comparação com as da pele.

Melhorar estas características físico-químicas e mecânicas das nanofibras de colágeno usadas para regeneração tecidual, foi alvo de estudos com o objetivo de incrementar e/ou melhorar o potencial de adaptação e manuseio do biomaterial obtido, sem afetar a biocompatibilidade, assim como as propriedades biológicas do material. Para isso, neste trabalho o colágeno foi utilizado como um segundo biomaterial nas fibras eletrofiadas.

Por este motivo, foi realizado um estudo usando o colágeno na obtenção de um biomaterial, visando a regeneração da pele. No entanto, produzir fibras eletrofiadas com polímeros provenientes de fontes naturais apresenta algumas dificuldades quando comparado com a fiação de polímeros sintéticos. Por esse motivo, foi realizado estudo de

fiação do colágeno tipo I, usando como suporte de fiação poli(álcool vinílico), avaliando as variáveis com maior influência no processamento como a vazão, a voltagem, a distância de percorrido e a relação em massa de Col\_1/PVA (LI *et al.*, 2017).

Como foi registrado na literatura, existe uma dificuldade para eletrofiar o colágeno puro, que está relacionado principalmente à sua estrutura e solubilização, o que tem sido um impedimento para preparação de estruturas nanofibrilares contendo apenas colágeno I, sem hidrolisar a sua estrutura (ELAMPARITHI *et al.*, 2015). Como foi registrado em 2015 por PUNNOOSE *et al.*, que realizaram estudo com objetivo de avaliar esta problemática, listando diversos problemas relacionados a fiação desta macromolécula. Um dos principais problemas da fiação do colágeno relatado pelos autores baseia-se na dificuldade da solubilização. Essa dificuldade é atribuída às longas cadeias, além da sua estrutura helicoidal tripla. Com o propósito de criar nanofibras de colágeno tipo I, diminuindo a degradação e/ou a hidrólise do polímero, foi proposto usar o poli(óxido de etileno) (PEO) de ultra massa molar, como polímeros coadjuvante de fiação proposto para a produção de fios com diâmetros homogêneos e estáveis livres de defeitos.

No entanto, nesta pesquisa usou-se o poli(álcool vinílico) (PVA), devido ser um polímero de fácil fiação, hidrossolúvel que apresenta excelente biocompatibilidade. Além disso, foi relatado por LIN *et al.* em 2012 que as fibras formadas pela mistura de PVA com o colágeno tipo I promoveu melhoras na proliferação dos fibroblastos sobre as fibras, assim como também nas propriedades mecânicas, quando comparadas com as fibras fiadas de colágeno puro. Esses resultados anteriores mostraram, assim, a viabilidade na implementação do colágeno como camada na superficial de fibras de PVA para produzir um material adequado para a aplicação proposta neste trabalho – estruturas porosas para tratamento dérmico.

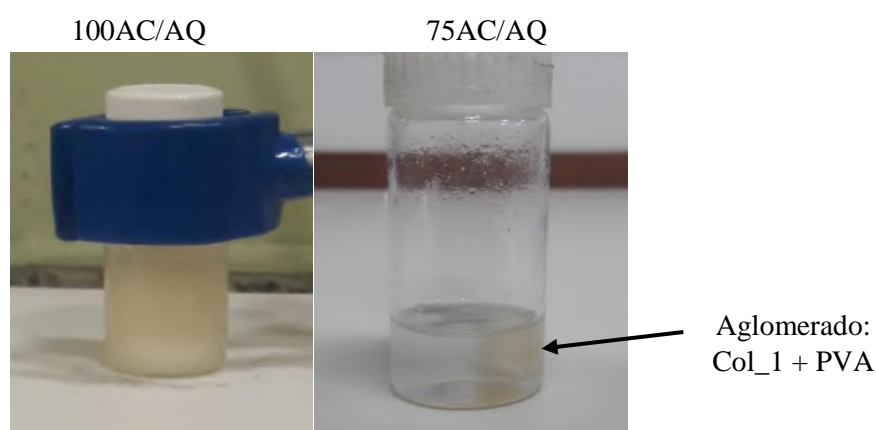
### **5.2.1 Avaliação na formulação da solução Col\_1/PVA.**

Inicialmente, foi testado o processo de eletrofiação do colágeno I puro, com uma concentração de 4%, p/v usando como solvente AC:AQ (1:1). Porém, não foi possível a eletrofiação da solução, que apenas gotejava durante o processo. A solução foi testada em eletrofiação, variando a voltagem, a distância percorrida e a vazão, como mostrado na Tabela 11.

**Tabela 11.** Condições de eletrofiação utilizadas para misturas de Col\_1/PVA.

Conc. total polímero (%)	Razão Colágeno:PVA	Conc. PVA (%)	Distância (cm)	Voltagem (kV)	Vazão (ml/h)
4	4:0	0	10 - 15	10 - 20	0,2
	2:1	2			0,2, 0,5
	1:1	4			0,2-0,5

O colágeno 1 utilizado neste trabalho se mostrou de difícil de solubilização. Porém com a solução preparada de colágeno puro (0% de PVA), observou-se que a solução não conseguiu atingir uma estabilidade duradoura característica, ocorrendo separação de fases uma vez deixada em repouso após mistura por agitação magnética, como é mostrada na Figura 26. A solução apresentou aglomerações do colágeno solubilizado após de 12 horas de repouso a temperatura aproximada de 4°C. Para esta solução, não foi possível conseguir as condições para a formação do cone de Taylor e, consequentemente a eletrofiação das soluções. A impossibilidade de eletrofiar o colágeno puro foi atribuída à impossibilidade em obter soluções homogêneas deste colágeno, já que as soluções obtidas foram instáveis de tal forma, que apresentaram separação de fases uma vez deixadas no repouso após da mistura.



**Figura 26.** Imagens da solução de colágeno tipo I em AC glacial e água ultrapura (AQ) com relação volumétrica. A) solução após da solubilização. B) Solução de 75Col\_1/PVA após de 12 horas em repouso a 4°C.

A solução 2% Col\_1/PVA e 4% Col\_1/PVA foram levadas a eletrofiação, variando a vazão e a voltagem. No entanto, só foi possível eletrofiar e obter fibras com diâmetros homogêneos como foi observado no item seguinte.

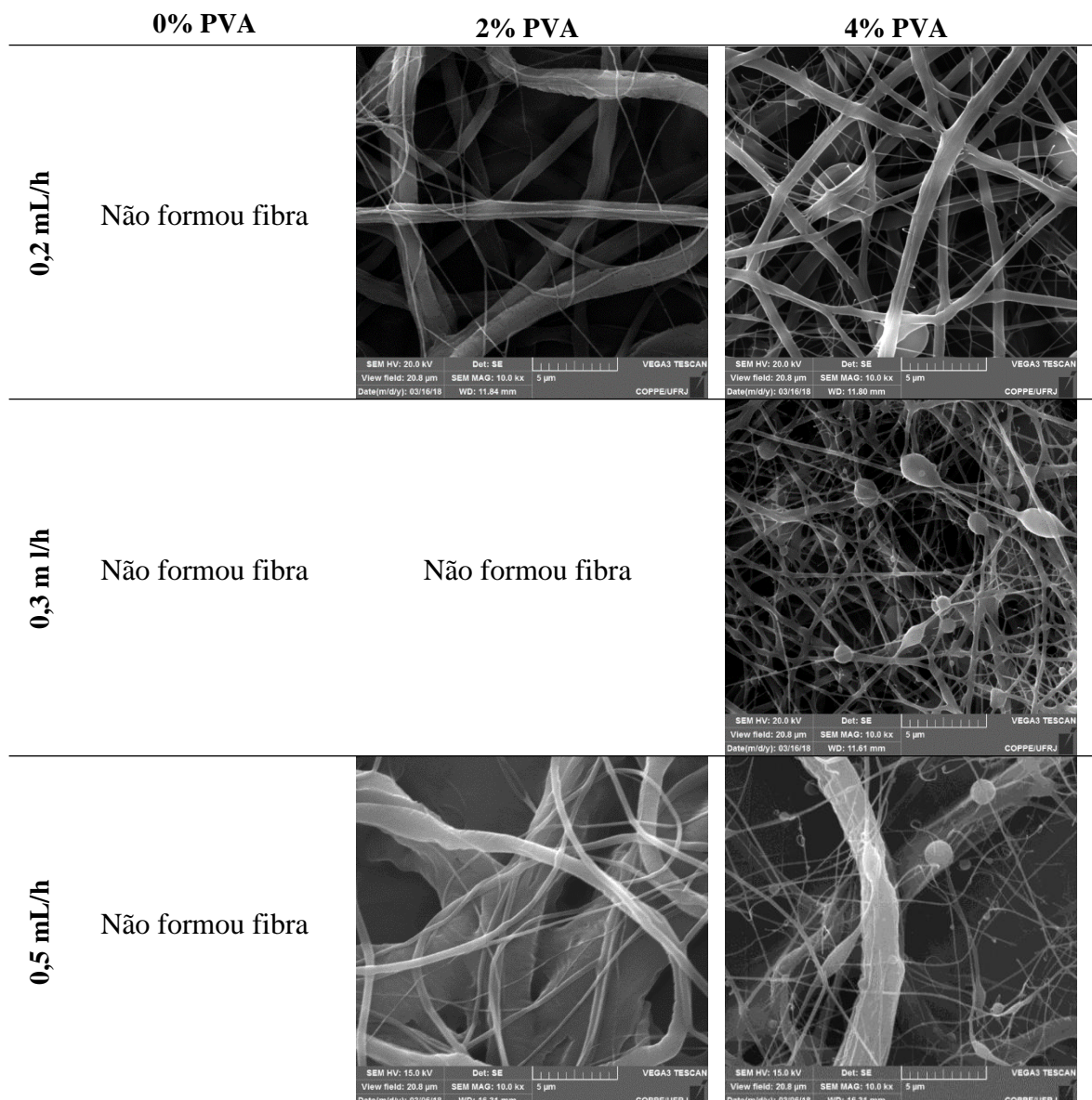
### **5.2.2 Avaliação morfológica das fibras de Col\_1/PVA.**

Para as concentrações de 2% de Col\_1/PVA foram formadas fibras com dois diferentes diâmetros. Para uma vazão de 0,2 ml/h, foram encontradas fibras na escala nanométrica com diâmetro médio de 132 nm e outras fibras com diâmetro de 1.113 nm. Esta diferença nos diâmetros pode ser atribuída à instabilidade da solução, criando jatos duplos, assim como uma possível separação do PVA do colágeno, como foi descrito por GOLÇALVES em 2015, que relatou que o PVA possui a característica de formar fibras finas na escala nanométrica (121 nm). O valor de diâmetro encontrados pelo autor é próximo ao diâmetro encontrado para PVA neste trabalho.

Por outro lado, observa-se na Figura 27 que com o incremento da vazão, criou-se maior instabilidade no jato, promovendo deposições grosseiras na base do papel alumínio usado como alvo e uma camada de microfibras sobrepostas compostas possivelmente de PVA, gerando fibras com diâmetros maiores (243 nm). Tal fato poderia ser esperado, já que com o incremento da vazão, a quantidade do polímero disposta na ponta da agulha aumenta, gerando fibras com diâmetros maiores em relação as fibras obtidas na vazão de 0,2 ml/h.

Para dar continuidade ao trabalho, foi aumentada a concentração do PVA na solução de 2% para 4%, obtendo uma relação volumétrica 1:1 (4%Col\_1/PVA). Com esta nova solução foi possível encontrar fibras com diâmetros mais homogêneos. Também não se observou a separação dos componentes da solução na hora de fiação e a formação de um segundo jato. Por este motivo, foi realizado estudo mais detalhado das fibras obtidas com esta formulação.

Foi preparada solução de colágeno tipo I em conjunto com o PVA (4%Col\_1/PVA), na razão 1:1 em massa. Esta solução foi empregada no processo de eletrofiação por um tempo de 20 minutos em diferentes voltagens, para cada amostra para investigar o efeito da voltagem sobre a morfologia das fibras. Na Figura 27 são mostradas as imagens de MEV de fibras obtidas nas seguintes condições de processamento: distância percorrida, 16 cm; e voltagem, 17,5 kV. Essas condições foram usadas com o objetivo de manter a estabilidade do cone de Taylor durante o processo de eletrofiação.



**Figura 27.** Imagens de MEV das fibras eletrofiadas das soluções de 4% de Colágeno com variação da concentração de PVA com voltagem fixa de 17 kV e com variação da vazão: 0,2 ml/h; 0,3 ml/h e 0,5 ml/h.

Foi observada que com a solução de 4% Col<sub>1</sub>/PVA, obteve-se melhor formação de fibras para menores vazões, como mostrado na Figura 27, onde para uma vazão de 0,2 ml/h originou fibras com diâmetros mais homogêneos, que foi atribuído a uma maior estabilidade no cone de Taylor. A estabilidade mencionada parece ser alterada com o aumento da vazão, criando maior formação de contas e fibras com maior variação no diâmetro. No entanto, para a vazão de 0,5 ml/h, foram obtidos dois tipos de fibras com diâmetros completamente diferentes, atribuído à desestabilização do processo, que pode ter formado jato duplo, sendo um deles responsável pela diminuição significativa de

fibras, quando comparadas com as amostras obtidas para as duas vazões menores. O observado é concordante com o reportado por SHAMIM et al., em 2012, que demonstraram que com o aumento da vazão cria-se um acréscimo no diâmetro das fibras bem como o aumento no número de defeitos (fibras grossas com fibras menores), encontrando até mesmo fibras ramificadas. Defeito, como coalescência, foi atribuído há um tempo de voo menor ou inadequado para permitir a evaporação completa dos solventes usados no processo de fiação.

### **5.2.3 Análise estrutural das fibras eletrofiadas de Col\_1/PVA.**

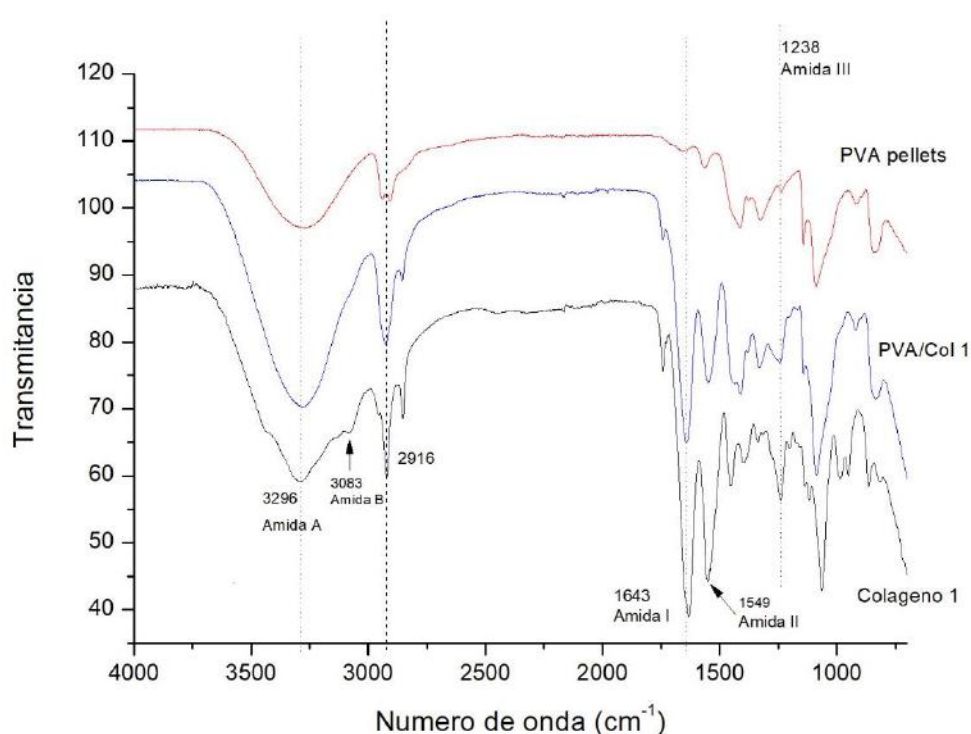
O objetivo de este estudo, foi obter um biomaterial com melhoria na biocompatibilidade com a pele, mostrando condições de adsorção similares com as do tecido hospedeiro. Para isto, implementou-se o uso do colágeno na formulação destas fibras. Neste ponto do trabalho, foi considerado relevante verificar a presença da estrutura típica que diferencia o colágeno tipo I, para corroborar que o colágeno não sofreu hidrólise ou degradação completa em nenhum dos estágios que envolve o processo de eletrofiação. Isto devido a que dita estrutura representa a presença do colágeno que a pele tem, a perda de esta estrutura tripla hélice representaria a degradação ou hidrólise do colágeno convertendo-o em outra proteína a gelatina.

A estrutura helicoidal característica do colágeno tipo I, foi estudada usando FTIR-ATR. As análises foram feitas na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com o objetivo de avaliar a composição química e estrutural dos três materiais utilizados nesta parte do trabalho, avaliando a preservação da estrutura da hélice tripla que compõe o colágeno tipo I. Assim, as fibras obtidas com a solução de 4% Col\_1/PVA foram analisadas e os espectros foram comparados com os espectros obtidos do colágeno nativo (Col\_1) e do PVA em pellets (Figura 28). A comparação das bandas relatadas na literatura e aquelas obtidas experimentalmente são apresentadas na Tabela 12, onde foram registradas as bandas características para o colágeno tipo I nativo, assim como para o PVA reportadas na literatura e comparadas com as bandas encontradas nas fibras eletrofiadas de Col\_1/PVA, assim como os materiais usados para o desenvolvimento destes filmes, avaliando a estrutura desta blenda, como foi mostrado por ZHANG *et al.*, 2016.



**Tabela 12.** Comparação entre as bandas encontradas na amostra 4%PVC/Col\_1 e as bandas características no espectro de infravermelho (FTIR-ATR) para o Colágeno tipo I (Col\_1) e o poli(álcool vinílico)

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		Tipo de vibração
Literatura	Experimental	
3312	3292	Vibrações do grupo N–H, O–H (amida A)
3086	3083	Vibrações de elongação C – H da Amida B
1652	1643	Vibrações de elongação da Amida I (C=O)
1550	1548	Vibrações de elongação da N-H e C-N (amida II)
1240	1239	Vibrações complexas C–N, N–H, CH <sub>2</sub> Amida III
1093	1064	Vibrações de elongação do C–O–H



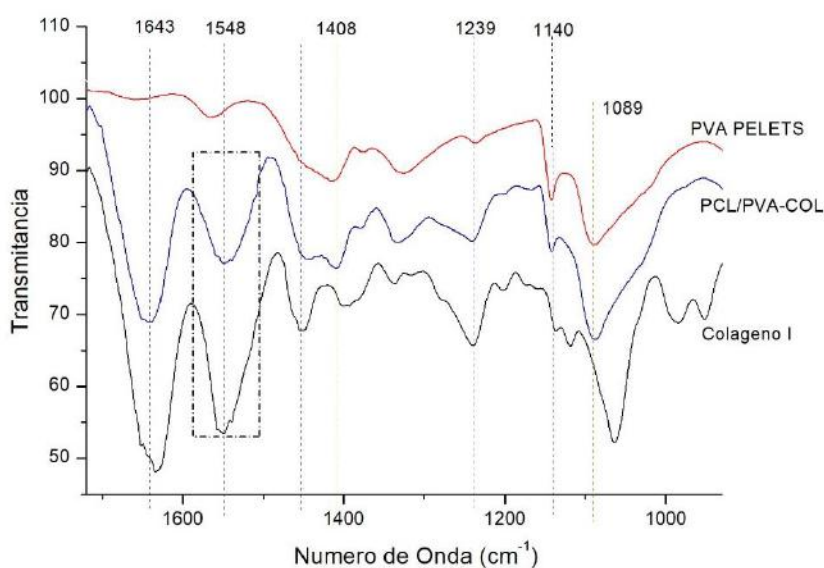
**Figura 28.** Espectros de FTIR-ATR comparativo para as fibras eletrofiadas de PVA-Col\_1, colágeno tipo I e pellets de PVA na faixa entre 4000 e 500 cm<sup>-1</sup>.

A Figura 28. apresenta bandas representativas no espectro de infravermelho, referentes ao colágeno tipo I, ao poli(álcool vinílico), assim como para as fibras eletrofiadas das misturas destes dois materiais, mostrando as bandas típicas do colágeno tipo I. Foi observado que a banda em 3296 cm<sup>-1</sup>, representa as vibrações de alongamento da ligação N-H referente à amida A presente no colágeno. A banda é também observada para o PVA. No entanto, é importante ressaltar que a banda mostrada para as fibras

eletrofiadas da solução de 4%Col\_1/PVA apresentou a mesma banda nesse número de onda, o que é concordante com o relatado por ZHANG *et al.*, que atribuiu a presença desta banda como evidência da não desnaturação total das cadeias micro fibrilares do colágeno tipo I em nenhum dos estágios do processamento de eletrofiação.

Por outro lado, foi observado que os solventes ácidos usados não influenciaram de forma significativa a hidrólise do colágeno, segundo o reportado em 2018 por XUESHI, et al. Os autores relataram um deslocamento da banda referente a amida A de  $3312\text{ cm}^{-1}$  para  $3278\text{ cm}^{-1}$  para o colágeno nativo, comparado com as fibras de colágeno I eletrofiadas, atribuindo a uma destruição significativa das cadeias microfibrilares do colágeno, devido a forças polares do solvente usado (HFIP) e as forças eletrostáticas submetidas durante a eletrofiação.

Neste trabalho, observou-se a presença da banda de absorção em  $3083\text{ cm}^{-1}$  referente à Amida B no colágeno puro. Não foi encontrada essa banda no espectro obtido para as fibras eletrofiadas de 4%Col\_1/PVA. O fato foi atribuído ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio intermoleculares. Além disso, observou-se (Figura 29) uma diminuição da intensidade da banda típica do colágeno relacionada com a estrutura helicoidal da hélice tripla em  $1548\text{ cm}^{-1}$ , o que demonstrou alterações significativas na estrutura do colágeno, que pode estar relacionada a perdas na sua estrutura secundária.

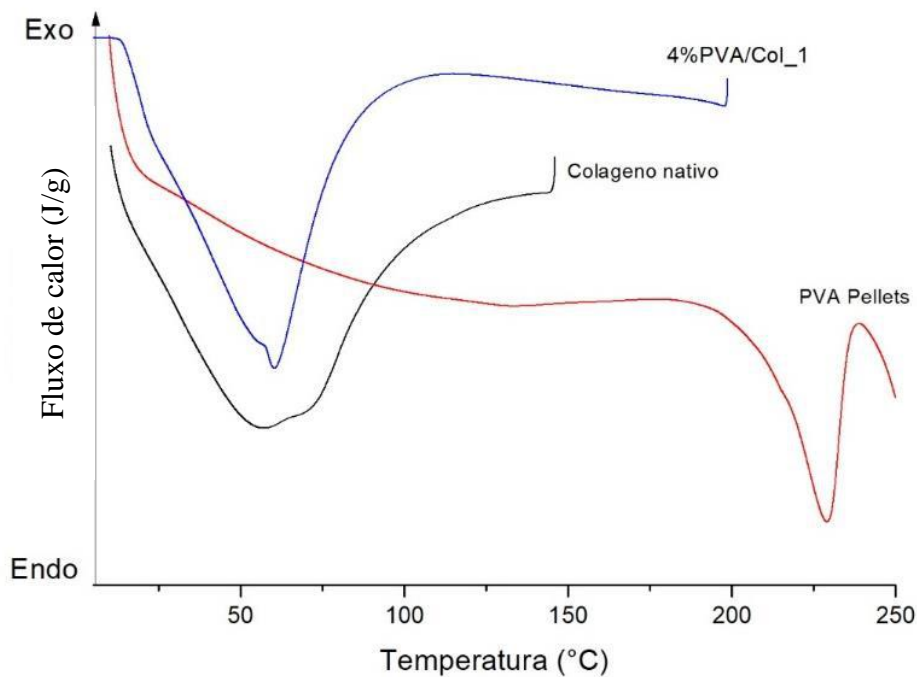


**Figura 29.** Região de 1000 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  dos espectros de FTIR -ATR comparativo para a banda de 1548 referente à estrutura helicoidal do colágeno I e após da eletrofiação.

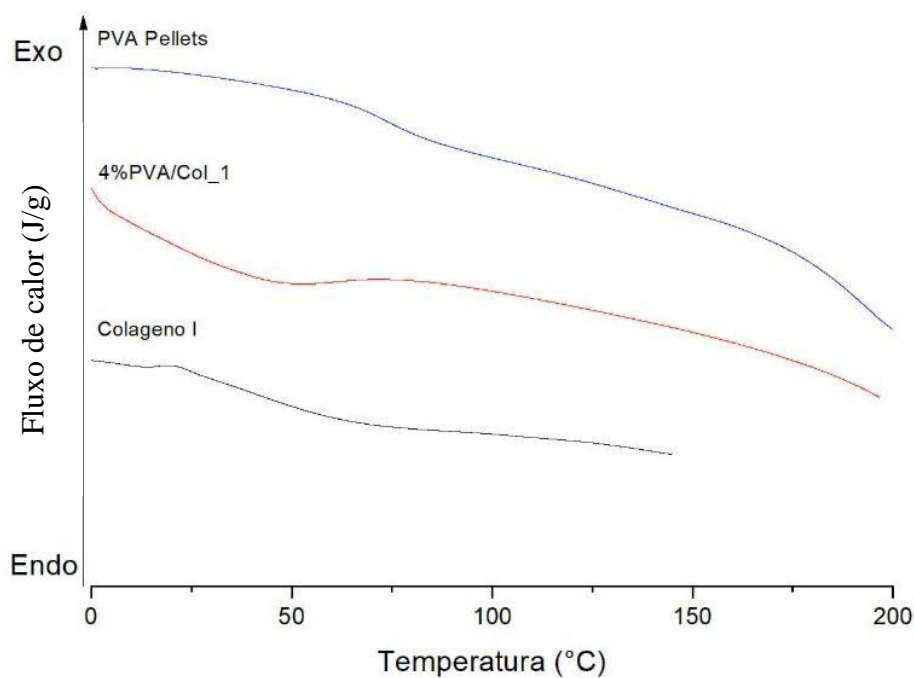
A evidente a diminuição da intensidade da banda localizada em  $1548\text{ cm}^{-1}$ , relacionada à amida II no espectro das fibras de Col\_1/PVA quando comparada com o espectro do colágeno I nativo, é ressaltada na Figura 29. Essa diminuição pode ser atribuída à desnaturação do colágeno no processo de eletrofiação, já que esta banda representa a presença da estrutura helicoidal da hélice tripla, característica do colágeno tipo I (KUMAR E FREUD, 2015). A quantificação desta hidrólise do colágeno foi avaliada pela intensidade das bandas referentes a amida B e especialmente pela banda de amida II ( $1548\text{ cm}^{-1}$ ) mostrada na Figura 29. Estas intensidades foram medidas usando estudo das áreas destas bandas obtidas para as fibras de 4% Col\_1/PVA, e por relação direta foi encontrado que após o processo de eletrofiação, o colágeno apresentou aproximadamente 45% de hidrólise na cadeia helicoidal. No entanto, não é possível afirmar que esta degradação ocorreu somente na eletrofiação, pois pode ter ocorrido também durante solubilização do colágeno, devido ao uso do aquecimento para melhorar a solubilização, tanto do PVA quanto do colágeno. Para estudar esta degradação, foi realizada a análise térmica das fibras, com o objetivo de avaliar como essa macromolécula natural apresenta-se na fibra.

#### **5.2.4 Análise térmica das fibras.**

Na Figura 30. , observa-se um pico endotérmico próxima a  $60^{\circ}\text{C}$ , atribuído ao processo de desnaturação do colágeno, mostrando que o colágeno utilizado possuía um índice médio de hidratação. Segundo SAMOUILLAN *et al.* (2011), que reportou que a temperatura de desnaturação do colágeno tipo I pode iniciar em  $36^{\circ}\text{C}$  e chegar a  $200^{\circ}\text{C}$  para colágenos completamente hidratado e completamente desidratado, respectivamente. Além disso, foi confirmada a desnaturação do colágeno como observado na curva de DSC da Figura 30. , o segundo aquecimento mostrado na não apresentou variações significativas para o colágeno.



**Figura 30.** Curvas de DSC do primeiro aquecimento na faixa de 0°C -250°C com fluxo de calor de 10°C/min. Avaliação térmica por DSC para as fibras de 4%PVA/Col, o Colágeno I e a PVA.



**Figura 31.** Curvas de DSC do Segundo aquecimento para as fibras de 4% Col\_1/PVA, PVA e colágeno I, na faixa de 0°C até 200°C.

Também foi observado nas curvas de DSC apresentadas nas Figura 30. e Figura 31. , que representam as transições térmicas para o colágeno e para as fibras de Col\_1/PVA,

que não são mostrados deslocamentos dos picos principais atribuídos ao processo de hidrólise da estrutura helicoidal do colágeno tipo I. No entanto, o pico referente as fibras eletrofiadas mostraram um pico mais estreito e com maior intensidade, quando comparado com o pico gerado para o colágeno puro. Esse comportamento pode estar relacionado à presença de cristais mais definidos nas fibras, devido à presença do PVA nas fibras eletrofiadas, que favoreceu o rearranjo das cadeias do colágeno no processo de fiação.

Por outro lado, foi observado que o segundo aquecimento (Figura 31) não apresentou pico característico de degradação do colágeno, esperado ocorrer em torno de 50°C ( $T_d$ ), o que demonstrou que a degradação do colágeno ocorreu por completo no primeiro aquecimento, conforme relatado por ASRAM et al., em 2010.

### **5.3 Eletrofiação de fibras núcleo-casca de PCL – Col\_1/PVA**

A obtenção de um biomaterial com estruturas similares às da MEC e capaz de promover a reconstituição da pele, usando materiais poliméricos com propriedades de compatibilidade com o tecido epitelial foi o foco principal deste trabalho. Para atingir este objetivo, procurou-se utilizar o colágeno para melhorar as condições de biocompatibilidade do biomaterial produzido ao entrar em contato com o tecido lesionado. No entanto, estudos desenvolvidos para a fiação do colágeno puro, mostraram uma grande dificuldade, atribuída a sua estrutura complexa (MILLAN, 2016).

Em trabalho publicado anteriormente na literatura, é relatado sucesso na obtenção de nanofibras de colágeno por eletrofiação, mas é registrado que as fibras possuíam baixa propriedade mecânica de tração quando comparadas com as propriedades mecânicas da pele (BURCH, *et al.*, 2017).

Por outro lado, outros estudos realizados para tratamento de feridas, usaram o PCL para obter mantas fibrilares com condições eficazes para este tipo de problemas, devido à biocompatibilidade, além de boas propriedades mecânicas de tração, o que faz deste tipo de manta fibrilar um promissor material para aplicação como curativos funcionais (VENUGOPAL et al., 2006; DIAS et al., 2016).

Com base nos estudos mencionados, foi proposto neste trabalho criar estruturas fibrilares formadas por colágeno e PCL, que possuam características de biocompatibilidade e adesão celular que o colágeno oferece ao biomaterial, mas com as propriedades mecânicas do PCL. Essa estrutura poderia permitir que o curativo produzido contasse com características eficazes para a regeneração da pele, contando com

propriedades mecânicas, físicas, químicas e estruturais próprias da MEC da pele. Porém, a mistura do colágeno com o PCL apresenta uma dificuldade relacionada com características químicas destes polímeros, já que o PCL é um polímero altamente hidrofóbico, enquanto que o colágeno apresenta características hidrofílicas. Para solucionar este tipo de problemática, foi implementada a preparação de fibras por meio da eletrofiação coaxial, com o objetivo de obter fibras com estrutura núcleo – casca. Assim, objetivou-se a obtenção de fibras que fossem constituídas por núcleo formado por PCL para favorecer a melhora nas propriedades mecânicas da fibra, e uma casca composta por uma blenda de PVA e colágeno para promover melhoras na biocompatibilidade.

Para a obtenção deste tipo de fibra realizou-se o estudo das variáveis que influenciam o processo de eletrofiação, tomando como ponto de partida as condições estudadas na eletrofiação monolítica destes materiais descritas no capítulo anterior. Para esta finalidade, foram testadas diferentes condições do processo de eletrofiação coaxial, com o objetivo de estudar a influência dessas variáveis na morfologia das fibras obtidas.

Com base nos estudos realizados para a eletrofiação monolítica, foram escolhidas para desenvolver esta fase da pesquisa as duas soluções dos dois diferentes polímeros constituintes da fibra núcleo-casca desejada. Para eletrofiar o colágeno, foi escolhida a solução 4%Col\_1/PVA com relação em massa de 1:1, no sistema de solvente AC-água (1:1). Para o PCL, foi usada solução com concentração de 10% de polímero, no sistema de solvente 70DMF/DCF.

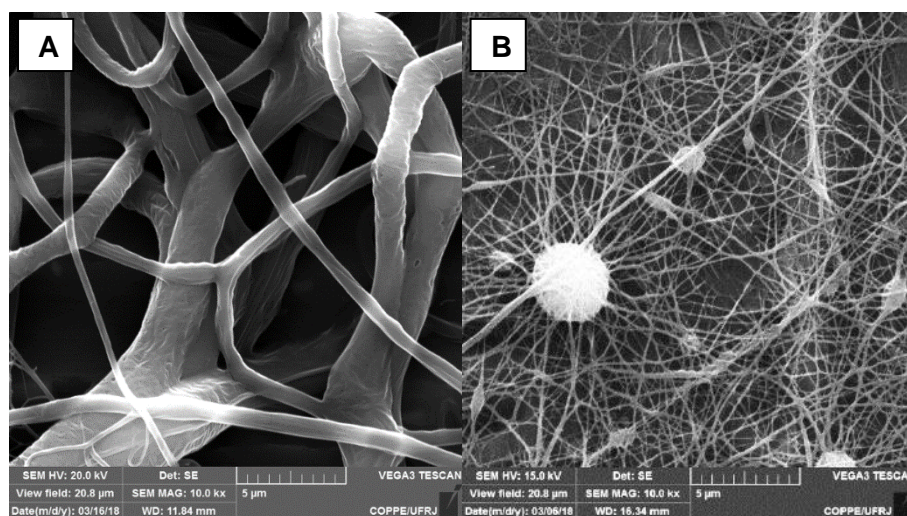
Para a obtenção das fibras núcleo – casca, as soluções foram dispostas de tal forma que a casca fosse formada pela mistura de PVA/colágeno, enquanto que o núcleo fosse formado por PCL. As soluções foram eletrofiadas usando um dispositivo com agulhas coaxiais desenvolvido no Laboratório de Catálise para Polimerização, Reciclagem e Polímeros Biodegradáveis (LCPRB) do IMA-UFRJ. Este estudo foi desenvolvido usando a influência de variáveis como: a vazão, a voltagem e a distância de percorrido sobre a morfologia das fibras produzidas. A avaliação morfológica foi realizada usando análises de MEV, como será descrito a seguir.

### **5.3.1 Influência da Vazão nas fibras núcleo – casca.**

Como observado na eletrofiação monolítica, a vazão é uma das variáveis com maior influência na morfologia das fibras, motivo pelo qual o estudo de condições ótimas para o processo de eletrofiação coaxial foi desenvolvido. Devido ao uso de duas soluções

simultâneas neste processo, estas variações influenciam significativamente a formação das fibras com estrutura núcleo – casca.

Primeiramente, foi estudada a influência da vazão da casca no processo. Para isto, foi fixada a vazão do núcleo (solução de PCL) com valor de 0,05 ml/h, variando somente a vazão da solução da casca (4%Col\_1/PVA). Os resultados obtidos encontram-se nas micrografias da Figura 32., onde é apresentado um comparativo da morfologia das fibras obtidas com duas vazões diferentes da solução que gerou a casca das fibras coaxiais, 0,3 e 0,2 ml/h. Como observado Figura 32.A para a vazão de 0,3 ml/h, obteve-se fibras aleatórias com diâmetros de aproximadamente 3,9  $\mu\text{m}$ . Entretanto, estas fibras não possuem uniformidade no diâmetro, mostrando diâmetros muito maiores que os diâmetros encontrados para a vazão de 0,2 ml/h (167,7;  $\pm$  70,4nm). Esse resultado é concordante com os resultados relatados por DA SILVA (2017), que obteve um incremento no diâmetro das fibras obtidas por eletrofiação coaxial ao aumentar a vazão da casca. O autor atribuiu o aumento no diâmetro da fibra a uma elevada quantidade de solução polimérica que gerou cordões como resultado da desestabilidade do cone de Taylor.

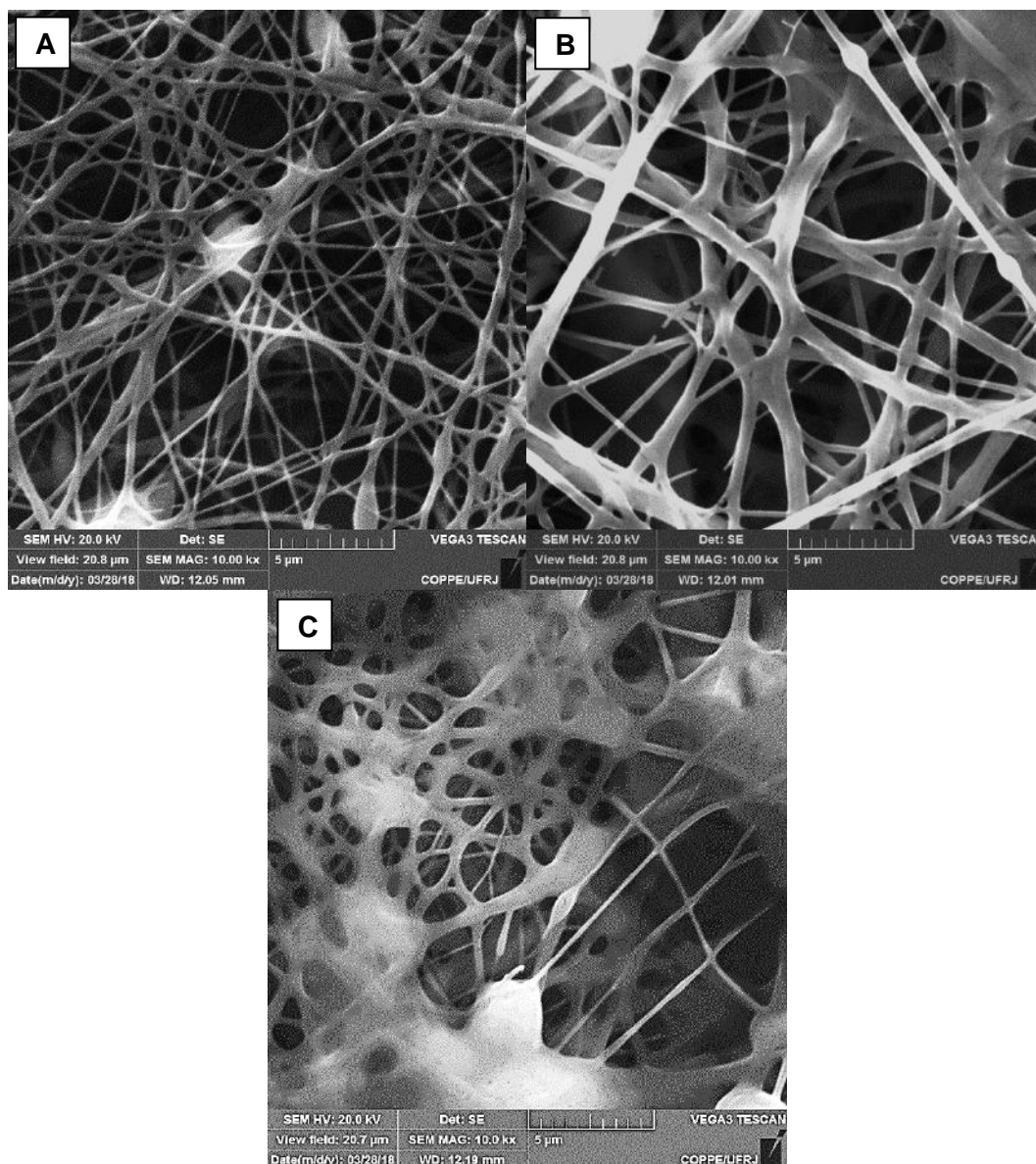


**Figura 32.** Imagens de MEV mostrando a influência da vazão da casca na morfológica do sistema coaxial de Col\_1/PVA – PCL, usando 17 kV e 10 cm de distância percorrida. A) vazão casca: 0,3 ml/h. B) vazão casca: 0,2 ml/h.

Após do estudo da influência da vazão da casca na formação das fibras coaxiais, foi realizado um estudo do efeito da vazão da solução formadora do núcleo das fibras, tomado como fixa uma vazão da casca de 0,2 ml/h, distância de percorrido de 10 cm e voltagem de 17 kV, conforme havia sido estabelecido nos estudos de eletrofiação monolítica.



Foi variada a vazão da solução de PCL em três diferentes valores com o objetivo de estudar a influência desta na eletrofiiação coaxial. Isto foi feito considerando que é importante fornecer uma quantidade de material interno de tal forma que seja possível formar uma fibra interna fina e contínua. Como foi registrado na literatura, para a formação do cone de Taylor na eletrofiiação coaxial, é importante manter uma relação entre as vazões interna e externa de forma tal que seja mantido um jato concêntrico das duas soluções, evitando deformações e/ou defeitos, assim como o gotejo das soluções sobre o coletor. Os resultados do estudo desenvolvido para avaliar a influência da vazão interna da solução de PCL (0,05, 0,06 e 0,07 ml/h) sobre a morfologia das fibras é mostrada na Figura 33.



**Figura 33.** Imagens de MEV das fibras núcleo – casca com variação na vazão do núcleo (PCL) usando 17 kV e 10 cm de distância percorrida: A) 0,05 ml/h. B) 0,06 ml/h. C) 0,07 ml/h.



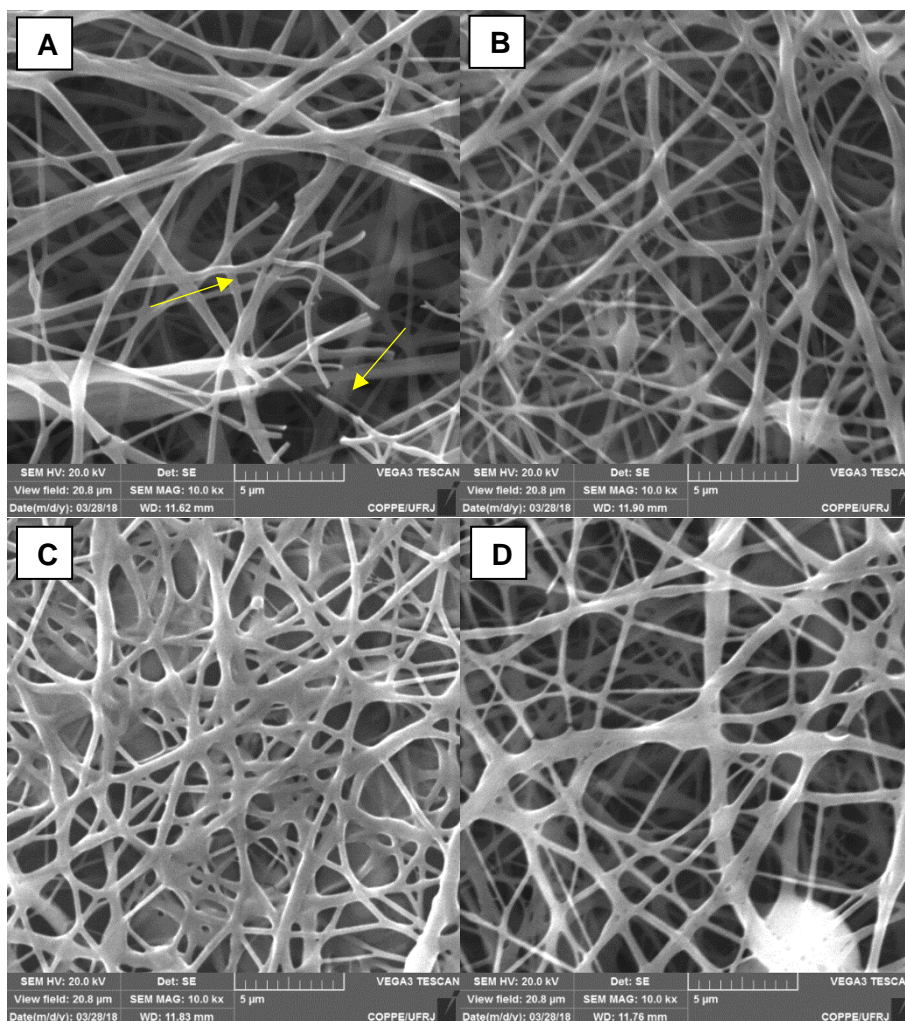
Na Figura 33, é visto que a vazão interna influencia diretamente a formação de fibras homogêneas, que é atribuída à estabilidade do cone de Taylor, devida à baixa razão entre as duas vazões usadas no processo de eletrofiação (2,86) para a vazão de 0,07 ml/h. Também se observa aglomerados nas fibras produzidas, o que foi atribuído ao gotejamento apresentado nesta vazão.

Por outro lado, a diminuição da vazão da solução de PCL interna resultou na redução do diâmetro médio da fibra, como observado na Figura 33. De acordo com as micrografias mostradas na Figura 33.A e 33.B, foi encontrado para a vazão de PCL de 0,05 ml/h um diâmetro de 278,5 nm ( $\pm 98,2$ ), e para a vazão de 0,06 ml/h um diâmetro médio de 430 nm ( $\pm 231$ ). Esses resultados mostram que a vazão interna influencia diretamente a morfologia das fibras fiadas, concordando com o reportado por ELAHI et al. (2010), que observaram que, se a vazão interna é muito baixa, são observadas descontinuidades no núcleo da fibra obtida. No entanto, se a vazão é muito alta, será criada uma desestabilidade no cone de Taylor, fazendo com que os dois jatos eletrofiados se separem, criando fios com composições diferentes, não confinados.

### **5.3.2 Influência da voltagem nas fibras.**

Realizou-se estudo da influência da voltagem usada no processo de eletrofiação na formação das fibras com morfologia núcleo – casca. Para isto, foi variada a voltagem, considerando as melhores condições de vazão encontradas para as duas soluções usadas, objetivando otimizar a melhor voltagem capaz de produzir fibras núcleo – casca contínuas, sem contas ou perolas, e com diâmetros relativamente uniformes.

Nesta etapa da pesquisa, foi analisada a voltagem na faixa compreendida entre 15 – 20 kV, valores obtidos na eletrofiação monolítica para cada um dos materiais estudados. Os resultados do estudo sobre a influência da voltagem na morfologia das fibras são apresentados nas imagens de MEV da Figura 34.



**Figura 34.** Imagens de MEV mostrando a influência da voltagem na morfologia das fibras núcleo – casca obtidas com o sistema de PCL-Col\_1/PVA com 10 cm de distância percorrida: A) 15 kV, B) 16 kV, C) 17 kV e D) 19 kV.

Pela Figura 34. , foi possível observar a formação de fibras homogêneas, mostrando que as quatro tensões aplicadas se encontravam dentro do intervalo necessário para superar a tensão superficial das soluções poliméricas utilizadas. No entanto, para a variação da voltagem de 15 para 16 kV, observou-se diminuição do diâmetro médio de 323,1 nm ( $\pm 91,6$ ) para 345,9 nm ( $\pm 171,4$ ), respectivamente. O resultado observado pode ser atribuído as forças eletrostáticas que atuam nas soluções, permitindo maior aceleração do jato durante a formação da fibra, o que resulta em diâmetros menores. Porém, quando a tensão é mais alta (17 e 19 kV), há a formação de fibras colapsadas, devido à alta velocidade do jato formador da fibra, que não permite a evaporação completa dos solventes (VELLAYAPPAN *et al.*, 2016).

Para as micrografias apresentadas na Figura 34C e 34D de fibras obtidas com tensões de 17 e 19 kV foi observada fusão das fibras formadas, além da presença de

contas para a voltagem de 19 kV. A presença desses defeitos foi atribuída a uma voltagem excessiva para as soluções dos polímeros utilizados, em concordância com o que foi mencionado no parágrafo anterior.

Uma vez estudada a influência da voltagem, foram fixadas as condições de operação da eletrofiação coaxial, tendo-se a vazão do núcleo e da casca, assim como a voltagem que gerou as melhores fibras. Com essas condições já definidas, se realizou um estudo para encontrar a melhor distância entre a agulha e o coletor, que será discutido a seguir.

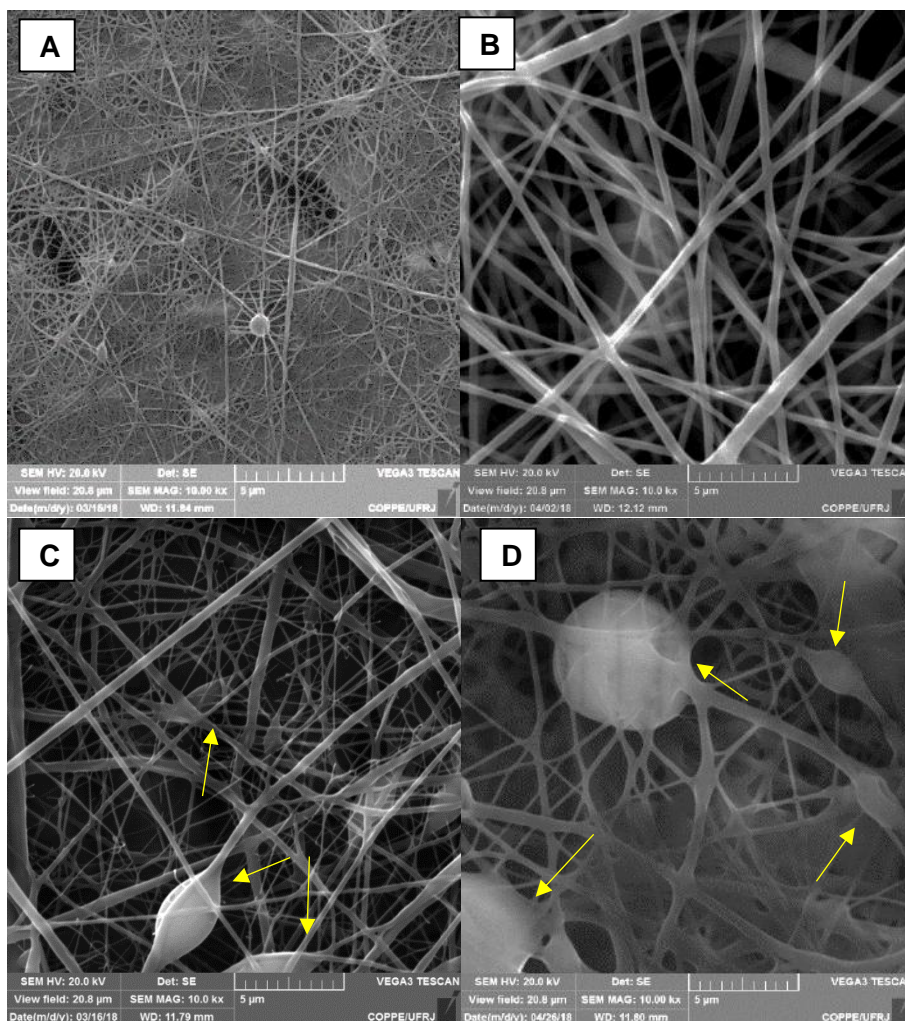
### **5.3.3 Influência da distância percorrida.**

Como foi descrito para a eletrofiação monolítica, a distância percorrida pelas fibras fornecerá as condições necessárias para que os solventes usados sejam evaporados, permitindo a deposição das fibras secas, evitando assim a coalescência entre elas. Porém, na eletrofiação coaxial, por se tratar de duas soluções diferentes, é importante avaliar a evaporação dos solventes, considerando as diferenças químicas existentes entre eles.

Para este sistema de eletrofiação coaxial foram usadas quatro diferentes distâncias percorridas (10, 12, 14 e 16 cm). As micrografias obtidas para cada uma das distâncias usadas são mostradas na Figura 35.

Como pode ser observado na micrografia gerada pela eletrofiação coaxial com uma distância de 10 cm, as fibras apresentaram aglomeração, o que indicou que a distância não permitiu a evaporação completa dos solventes. Concluiu-se que, mesmo que fossem geradas fibras, elas se fundiriam conforme fossem depositadas no alvo, diminuindo ou eliminando os espaços vazios entre as fibras.

Por outro lado, nas micrografias geradas a partir de fibras obtidas com as outras três distâncias geraram fibras sem aglomerações. Entretanto, para as distâncias de 14 e 16 cm, foram encontrados contos e defeitos que aumentaram em tamanho com o aumento da distância, além de fibras com variações significativas no diâmetro, atribuído possivelmente a distâncias percorrida promover leves desestabilizações no cone de Taylor.



**Figura 35.** Imagens de MEV mostrando a influência da distância percorrida na morfologia das fibras núcleo-casca obtidas por eletrofiação coaxial. A) 10 cm, B) 12 cm, C) 14 cm e D) 16 cm.

Finalmente foi observada na Figura 35. B fibras com diâmetros mais homogêneos (346,6 nm;  $\pm 179,3$ ), demonstrando que 12 cm parece ser a distância mais adequada para a fiação, já que parece ter permitido a evaporação completa dos solventes usados nas duas soluções poliméricas.

Após serem avaliadas a influência das variáveis vazão, voltagem e distância percorrida na eletrofiação coaxial sobre a morfologia, foram escolhidos os melhores valores para obter estruturas fibrilares com fibras núcleo – casca (Tabela 13).

**Tabela 13.** Valores usados para a obtenção de amostras núcleo – casca.

Variável	Valor	Unidades
Vazão PVA/Col 1	0,2	ml/h
Vazão PCL	0,05	ml/h
Voltagem	16	kV
Distância de percorrido	12	cm

Uma vez preparadas, as amostras de fibras foram caracterizadas com o objetivo de avaliar a formação da estrutura núcleo – casca. Entre as técnicas de caracterização, avaliou-se a superfícies das fibras por microscopia de fluorescência, ângulo de contato e FTIR-ATR. Foi realizado ainda um estudo *in vitro* da degradação do colágeno com o intuito de avaliar a cinética de entrega de ativo que o filme teria para ser usado como curativo para pele.

#### **5.3.4 Microscopia de fluorescência**

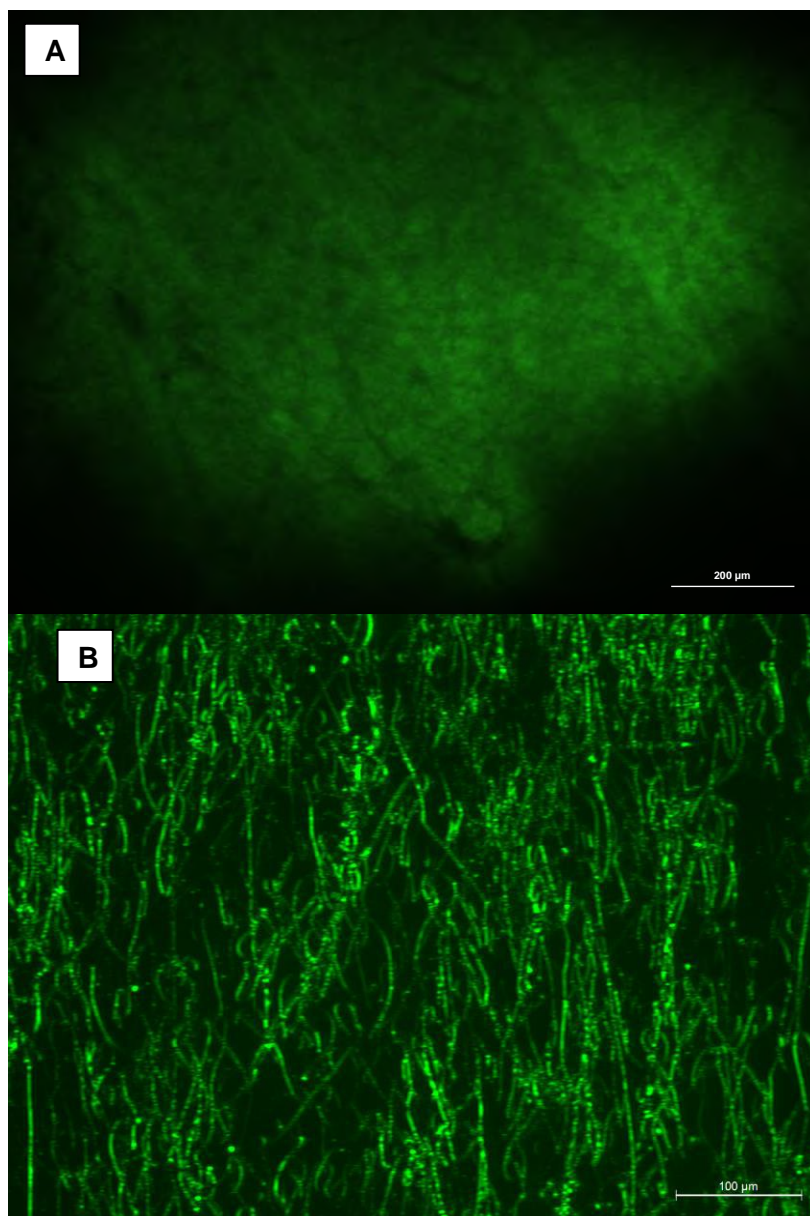
Foi realizado estudo do recobrimento das fibras pela mistura de Col\_1/PVA usando microscopia de fluorescência. Para isto, foi usada a Rodamina, a qual foi adicionada na solução antes da eletrofição com o objetivo de fixa-la nas cadeias do colágeno.

A Rodamina presente na solução externa das fibras permitiu identificar as fibras cuja superfície estivesse sido formada pela solução de 4%Col\_1/PVA, já que ao ser submetidas ao feixe de luz de fluorescência, estas apresentariam uma coloração verde brilhosa. Os resultados deste estudo são mostrados na Figura 36. .

Na Figura 36A, são mostradas fibras eletrofiadas de PCL com rodamina. Observa-se que as fibras apresentaram contraste com o fundo verde dada pela coloração da lâmpada. Porém, as fibras não mostraram nenhum indício de adesão da rodamina nas cadeias do polímero. Também foi possível observar que as fibras produzidas com o sistema de agulhas coaxiais (fibras núcleo – casca) mostraram uma coloração verde brilhante na superfície delas mostrando com que as fibras contam com uma camada superficial de Col\_1/PVA. Esses resultados sugeriram a possível obtenção de fibras núcleo-casca.

Outra forma de corroborar se as fibras obtidas nesta pesquisa possuem uma estrutura de núcleo – casca, se baseou no aproveitamento da diferença na hidrofobicidade existente entre o PCL e a solução de Col\_1/PVA. Para alcançar este objetivo, foi realizado medição do ângulo de contato entre os três filmes produzidos e estudados neste trabalho.



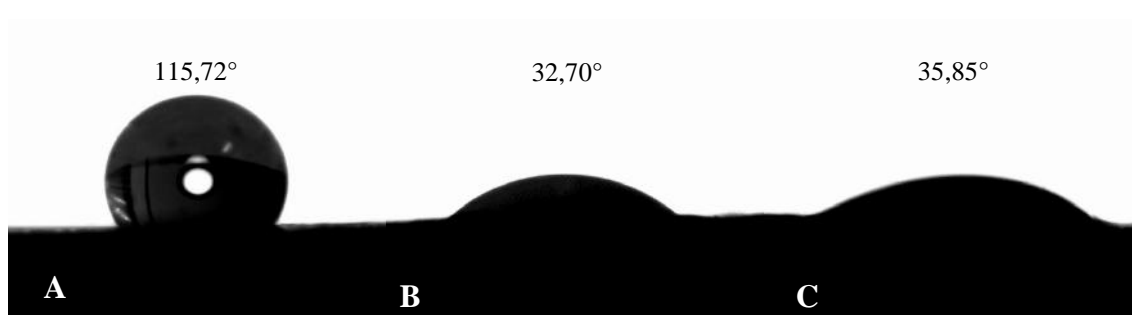


**Figura 36.** Micrografias de fluorescência para: A) sistema núcleo-casca composta por PCL no núcleo e PVA/Col 1 na casca. B) fibras monolíticas de PCL.

### 5.3.5 Molhabilidade dos filmes

Com base na hidrofobicidade das fibras de PCL, foi realizada a análise de ângulo de contato com o objetivo de avaliar o recobrimento das fibras com a blenda de COL\_1/PVA. Considerando que tanto o colágeno como o PVA são materiais altamente hidrofílicos, o que indicaria que a sua presença na superfície das fibras geraria ângulos menores, devido à capacidade de molhabilidade e espalhamento da gota sobre a superfície do filme.

A Figura 37. mostra a gota depositadas sobre a superfície dos três filmes produzidos e estudados, com o propósito de avaliar a formação das fibras núcleo – casca. A figura mostra a gota sobre a filme de PCL (A), sobre o filme do COL\_1/PVA (B) e sobre um filme de fibras coaxiais (C). Foram medidos os ângulos externos formados entre a gota depositada e a superfície do filme analisado.



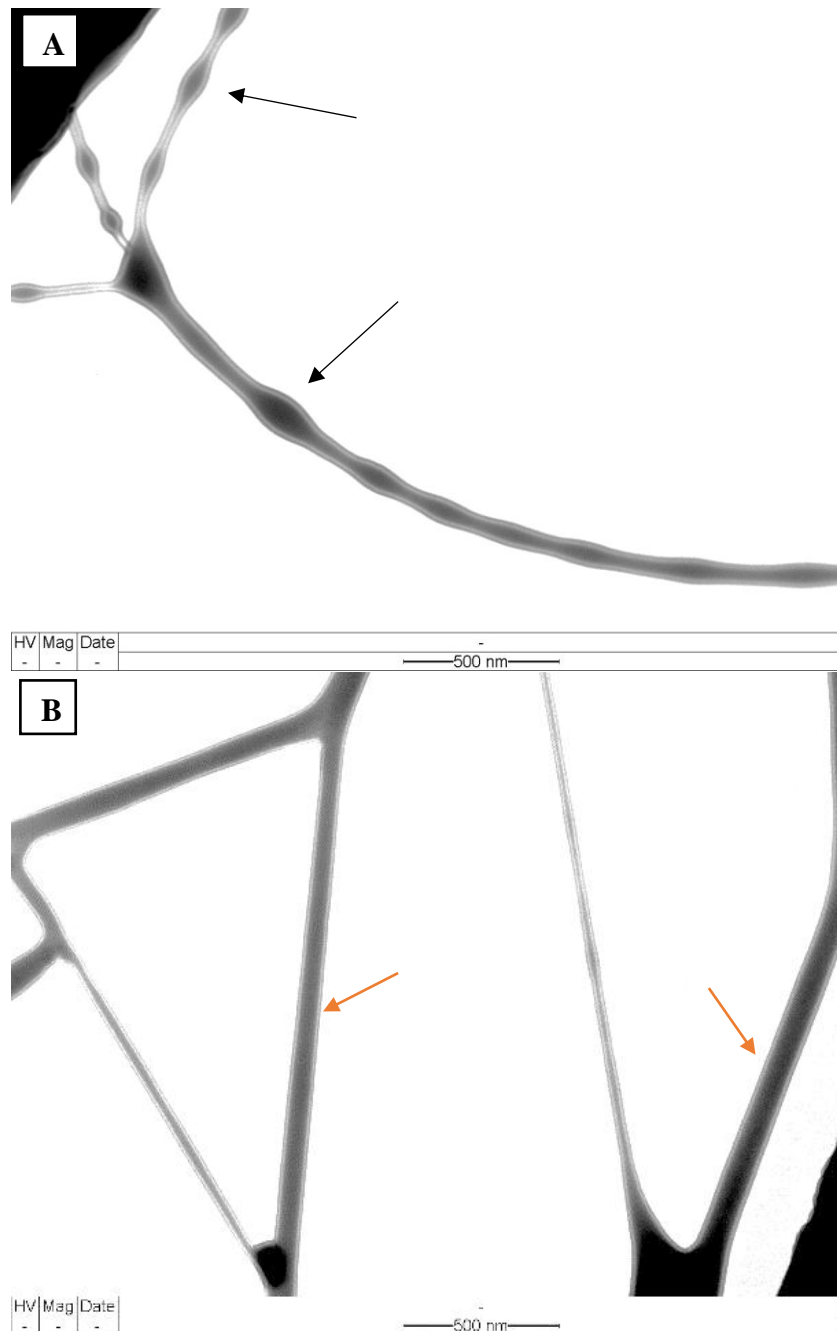
**Figura 37.** Medida do ângulo de contato para as fibras eletrofiadas. A) Fibras de PCL, B) Fibras de PVA/COL 1, e C) fibras núcleo – casca de PCL – PVA/COL 1.

Como mostra a Figura 37, o ângulo medido para o filme de fibras núcleo-casca (35,85°), encontra-se muito próximos aos ângulos medidos para as fibras monolíticas de COL\_1/PVA (32,70°), com uma diferença aproximada de 10% entre os filmes destas fibras. Para a superfície do filme de PCL, foi observado um ângulo da gota alto (115,72°), compatível com materiais altamente hidrofóbicos. Esse valor é relativamente distante ao encontrado para o filme de fibras núcleo-casca, indicando que a superfície do filme obtido por eletrofiação coaxial apresenta uma cobertura de Col\_1/PVA como era o esperado.

No entanto foi decidido realizar uma análise estrutural das fibras usando FTIR – ATR, com o objetivo de avaliar mais detalhadamente se o PCL foi recoberto por completo ou se ainda se encontra frações na superfície.

### 5.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão

A formação de fibras com estrutura núcleo-casca foi também investigada por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET), quando tentou-se confirmar a referida estrutura, avaliando a interface presente entre o núcleo e a casca das fibras. Para tal, aproveitou-se da diferença de densidade entre as duas fases. Para avaliar a influência das variáveis de eletrofiação sobre a espessura da casca e o diâmetro do núcleo, foi investigada principalmente a influência da vazão na casca e no núcleo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 39 e 39.

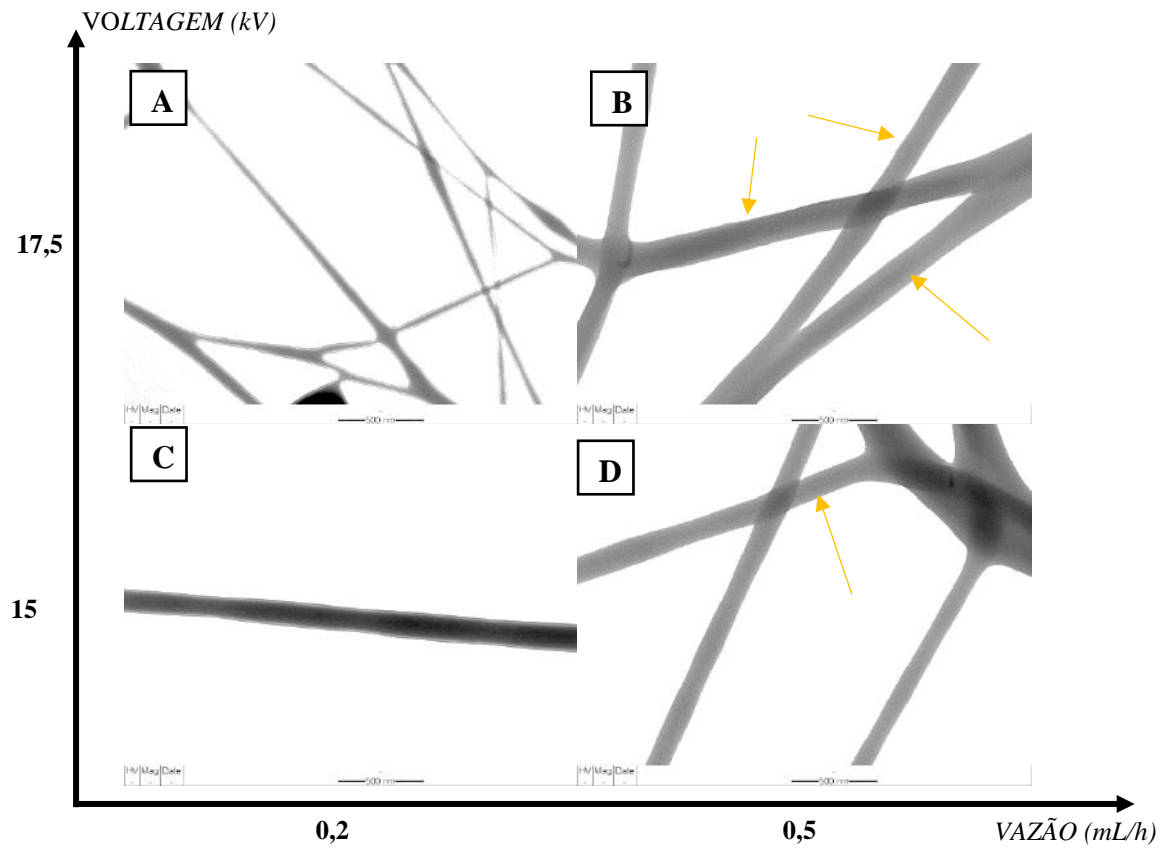


**Figura 38.** Microscopia de Transmissão das fibras núcleo – casca obtidas para o sistema de PCL – Col\_1/PVA

Como observado na Figura 39. , foram geradas fibras núcleo – casca, onde o núcleo das fibras apresentou continuidade em todo o seu comprimento. Porém, as fibras apresentaram espessura da casca muito fina comparada com o diâmetro da fibra interna. Isto atribuída a uma baixa relação entre as duas vazões (vazão do núcleo / vazão da casca). Além disso, pode se observar (Figura 38A) a formação de contas na fibra que compõe o núcleo das fibras o que corrobora uma vazão do núcleo elevada para o sistema trabalhado. A morfologia das fibras foi estudada variando a vazão da solução da casca e a voltagem aplicada. Porém, estas apresentaram diâmetros aleatórios (Figura 39. A), atribuídos a



cargas excessivas geradas pela alta voltagem aplicada. Os diâmetros foram medidos com o objetivo de avaliar estas variações e a influência das condições do processo na morfologia é apresentada na Tabela 14.



**Figura 39.** Microscopia de Transmissão das fibras núcleo – casca com variação da vazão e a voltagem.

A

**Tabela 14** mostra que há um incremento de aproximadamente 250% na espessura da casca das fibras com o aumento da vazão de 0,2 para 0,5 ml/h (aumenta de 14,11 para 34,98 nm), devido à maior quantidade de material disponível para a formação das fibras.

**Tabela 14.** Medidas de diâmetro das fibras núcleo – casca obtidas para as condições analisadas, Vazão no núcleo: 0,05 ml/h.

Variáveis		Diâmetros (nm)
Amostra A	Vazão: 0,2 ml/h Voltagem: 17,5kV.	D <sub>int</sub> : 68,50
		D <sub>nuc</sub> : 41,83
		D <sub>casc</sub> : 13,33
Amostra B	Vazão: 0,5 ml/h Voltagem: 17,5 kV.	D <sub>int</sub> : 101,76
		D <sub>nuc</sub> : 67,26
		D <sub>casc</sub> : 17,25
Amostra C	Vazão: 0,2 ml/h Voltagem: 15 kV.	D <sub>int</sub> : 134,84
		D <sub>nuc</sub> : 106,62
		D <sub>casc</sub> : 14,11
Amostra D	Vazão: 0,5 ml/h Voltagem: 15 kV.	D <sub>int</sub> : 162,26
		D <sub>nuc</sub> : 92,28
		D <sub>casc</sub> : 34,98

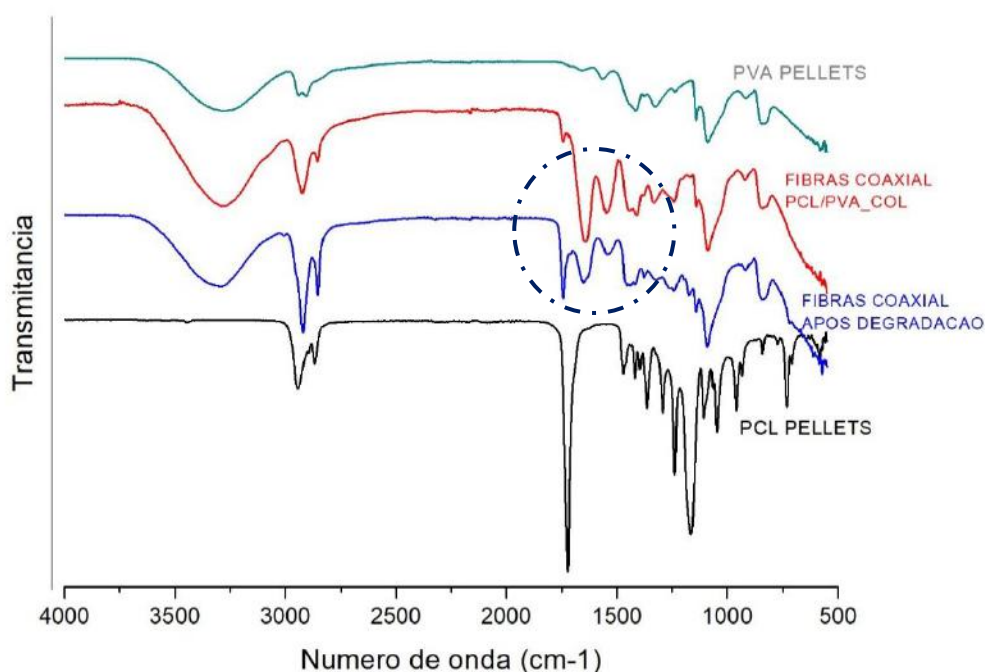
Como pode ser visto, todas as condições apresentaram um recobrimento de Col\_1/PVA. No entanto, este recobrimento contou com uma espessura de camada inferior à esperada, onde a fibra interna é a responsável principalmente pelo diâmetro total da fibra. Como exemplo, tem-se que para uma voltagem de 17 kV, as fibras apresentam uma razão diâmetro do núcleo/espessura da casca de 130%, próximo à metade da variação alcançada com voltagem e 15 kV. Além disso, foi visto que o aumento da voltagem também reduziu o diâmetro médio das fibras, passando de 68,50 para 134,84 nm (Tabela 14).

### 5.3.7 Avaliação da superfície das fibras núcleo -casca.

Como foi descrito anteriormente, o objetivo deste trabalho baseou-se na produção de nanofibras de PCL recobertas de Col\_1/PVA pela técnica de eletrospiação coaxial. Por

esse motivo foram realizadas análises para avaliar o recobrimento das fibras, aproveitando a diferença química existente entre os materiais usados, avaliando-o pela hidrofobicidade da solução de Col\_1/PVA, além do aproveitamento que oferece a técnica de FTIR-ATR para avaliar as interações dos polímeros na superfície das amostras.

Com base nisto, realizou-se análises de FTIR das fibras núcleo – casca obtidas, que foram comparadas com as fibras após o processo de degradação do colágeno e seus comparativos com os espectros do PCL e PVA em pellets. O estudo teve como propósito, realizar comparativo da composição da superfície das fibras após realizada a degradação (Figura 40. ). A figura apresenta o espectro do infravermelho na faixa de 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ , e mostra as bandas características para o PVA, o PCL e as fibras núcleo – casca compostas por PCL – PVA/Col I, obtidas por eletrofiação coaxial.



**Figura 40.** Espectros de FTIR comparativo das fibras núcleo-casca, PVA e Colágeno I.

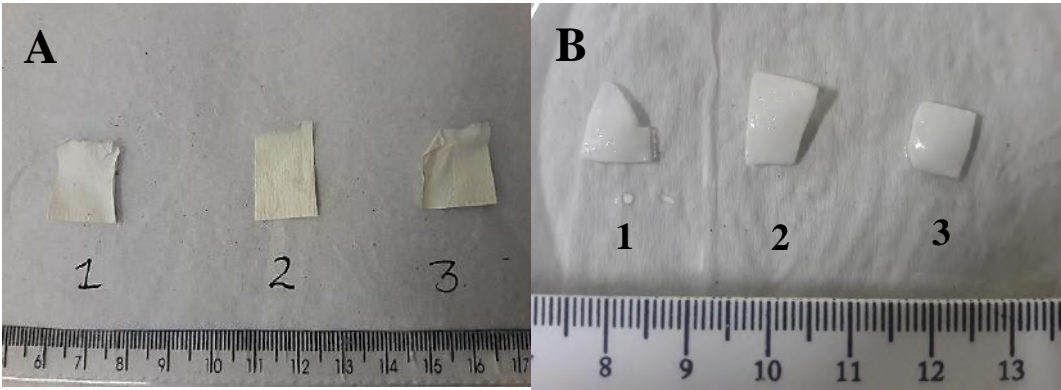
A banda de absorção com número de onda de 1720  $\text{cm}^{-1}$  encontrada no espectro do PCL, relacionada a vibrações do grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ), é característica de poliéster, e pode ser vista no espectro do filme tratado após da degradação. No entanto, é possível também observar a diminuição significativa das bandas em 1650  $\text{cm}^{-1}$  e 1545  $\text{cm}^{-1}$  referentes a amida I e a amida II, respectivamente nas fibras coaxiais.

Foi também realizado o estudo das bandas características do colágeno, com o objetivo de quantificar o teor de colágeno utilizando a intensidade das bandas características. Foi encontrada uma razão aproximada de 40% de colágeno nas fibras,

após a análise de degradação, em comparação com a intensidade das bandas referentes as amidas presentes nas fibras eletrofiadas núcleo – casca. Para comprovar esta perda de massa, foi realizada análise *in vitro* de degradação e de inchamento, que é descrito a seguir.

### 5.3.8 Ensaio de Intumescimento dos filmes

Com o objetivo de avaliar a velocidade de entrega de substâncias ativas para tecidos danificados, foi realizada análise de degradação do colágeno presente na casca das fibras eletrofiadas usando as melhores condições (Tabela 13). As amostras foram colocadas numa solução de soro fisiológico por 96 horas a 37°C, e foram preparadas três amostras do filme eletrofiado, após de 10 horas de processamento. Suas dimensões e peso foram registrados antes e depois do ensaio de intumescimento. As amostras foram pesadas antes e depois do ensaio de liberação, assim como as suas dimensões foram medidas (Figura 41. ).



**Figura 41.** Relação das amostras do filme com fibras núcleo –casca usadas para liberação do colágeno. A) amostras para análise de degradação. B) Amostras após 96 h de degradação.

Na Figura 41. são apresentaram as amostras usadas para o teste de intumescimento após de 96 horas. As medidas das dimensões das amostras foram realizadas usando o software *Size Meter*. Dessa forma, avaliou-se o grau de intumescimento das três amostras estudadas. Os valores medidos relacionados as dimensões e ao peso das amostras são mostradas na Tabela 15.

**Tabela 15.** Relação de medidas das amostras núcleo-casca antes e depois da liberação do colágeno.

Amostra	Antes da liberação			Após liberação e liofilização		
	Largura (cm)	Comprimento (cm)	Massa (mg)	Largura (cm)	Comprimento (cm)	Massa (mg)

<b>1</b>	1,58	1,82	44,6	0,86	0,99	8,9
<b>2</b>	1,42	2,21	60,4	0,83	1,14	14,4
<b>3</b>	1,75	1,74	46,4	0,64	0,82	9,5
<b>Media</b>	1,58	1,92	50,5	0,78	0,98	10,9

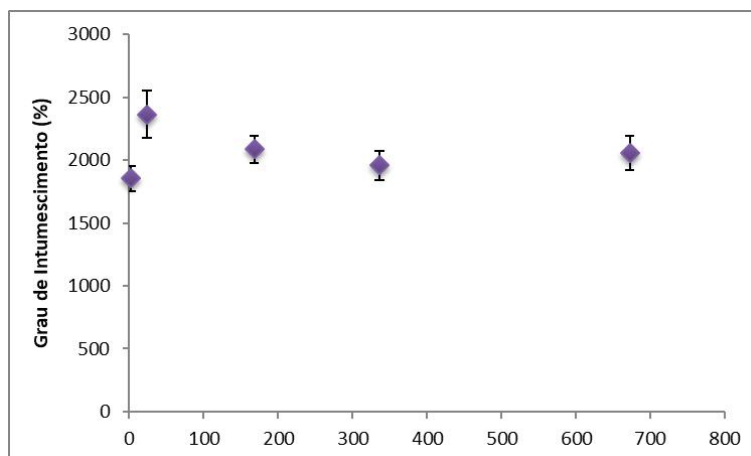
Como é evidenciado na Tabela 15, observou-se uma diminuição das dimensões das amostras, isto é, na largura e comprimento. No entanto, como pode ser visto na Figura 41, as amostras apresentaram um aumento significativo na espessura, devido à capacidade de absorção do soro usado para a degradação *in vitro*. Com os resultados medidos no dimensionamento das amostras foi realizado análise de desvio dimensional para as três amostras.

A análise dimensional das amostras após da análise de degradação mostrou perdas significativas da largura e comprimento de aproximadamente 50%. No entanto, a variação maior apresentou-se na quantidade de massa das amostras, onde após do ensaio de degradação, as amostras perderam aproximadamente 78% do seu peso, mostrando que uma grande parte do material que compõe a casca das fibras foi degradado e/ou liberado ao meio circundante (soro fisiológico) utilizado nesta análise. A quantificação do colágeno liberado, foi realizado por análise *in vitro* da proteína encontrada na solução usada como meio de simulação dos fluidos corpóreos.

Para a análise de intumescimento, foi realizada a pesagem das amostras durante o processo de inchamento das três amostras, analisadas cinco (5) vezes por um período de 96 horas, realizando medição do peso da amostra inchada e posteriormente o peso dela seca. Estes resultados são mostrados na Tabela 16.

Pelos valores vistos na Tabela 15, pode-se realizar análise da capacidade do filme eletrofiado de adsorver líquidos. Foi calculada a porcentagem intumescimento apresentada pelo filme estudado, que é registrado na Figura 42. .

O pico da absorção do soro fisiológico foi observado no início do ensaio (Figura 42) o que está relacionado principalmente a capacidade dada pelas cadeias poliméricas à entrada do meio (soro fisiológico) conseguindo esticar as cadeias até um estado relaxado no qual dito grau de intumescimento de equilíbrio se apresenta quando as forças de hidratação se igualam com as forças elásticas de reticulação como foi descrito por OLIVEIRA *et al.* (2014).



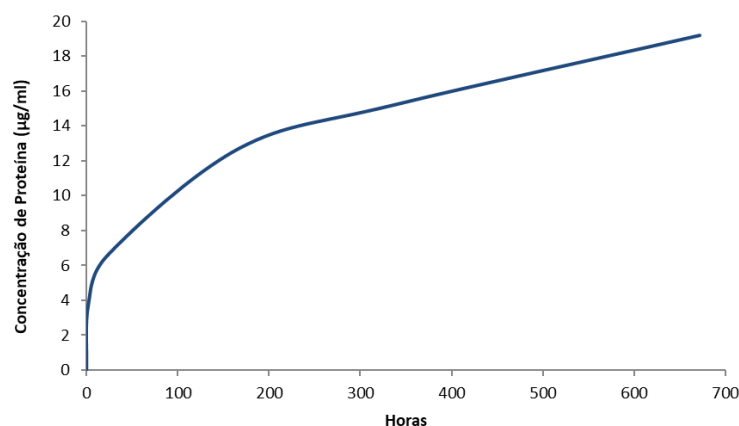
**Figura 42.** Grau de intumescimento dos filmes compostos por nanofibras núcleo – casca em função do tempo de imersão em soro fisiológico.

Como foi observado na Figura 42. , as amostras estudadas apresentaram o maior intumescimento nas 2 primeiras horas de análise, mostrando uma estabilidade na capacidade de absorção do líquido. Nas duas primeiras horas, os filmes geraram um incremento médio aproximadamente de 1850% do seu peso, mostrando uma capacidade elevada de inchamento relacionada com uma grande capacidade de absorção de líquidos, o que demonstra que este tipo de filme nanoestruturado apresenta capacidade especial de absorção dos exudados expelidos pela pele, servindo como um curativo promissor para a recuperação deste tipo de lesão. Apresentou significativo nível de inchamento, devido à absorção da solução usada para a degradação do colágeno, demonstrando sua capacidade de adsorção de líquidos.

### 5.3.9 Ensaio de degradação do Colágeno.

A quantidade de colágeno presente na solução analisada foi representada na Figura 43, onde se mostra o incremento da concentração de colágeno na solução com o tempo de exposição.

O colágeno liberado representa o colágeno que degradou no processo de cicatrização da ferida e seria adsorvido pela pele. Segundo mostra a Figura 43. , após aproximadamente 160 horas, observa-se diminuição da velocidade de liberação, tendendo a uma estabilização do colágeno, mostrando uma variação de aproximadamente 7 miligramas em um lapso de tempo de 504 horas (168 – 672 horas). Esses resultados sugerem que a liberação do colágeno ocorreu principalmente antes dos primeiros 7 dias da análise.



**Figura 43.** Avaliação da liberação do colágeno das fibras por eletrofiação coaxial em função do tempo.

Além da liberação apresentada anteriormente, é importante mostrar uma relação da perda de massa do filme estudado. Para isto, as amostras após a imersão por um determinado período de tempo foram liofilizadas com o objetivo de retirar toda a umidade. O valor das massas inicial e final está apresentada na Tabela 15.

Considerando a Tabela 15, verifica-se que a massa inicial média dos filmes coaxiais foi de 50,5 mg. Essa massa corresponde às moléculas de colágeno, PVA e PCL nas amostras. Ao final de 29 dias de imersão em soro fisiológico, a massa média das amostras liofilizadas foi de 10,8 mg (Tabela 15). Esta massa corresponde às moléculas de colágeno remanente na amostra, PVA e PCL. De acordo com a Figura 42, após 29 dias, foi determinada por espectroscopia de UV – VIS a concentração de colágeno em solução como 19,2 mg/ml. Considerando alíquotas de 2 mL, a massa de colágeno liberada foi de 38,4 mg. No entanto, pela diferença de massa das amostras antes e depois da liberação, seria esperado 39,7 mg de colágeno em solução ( $50,5 - 10,8$ ).

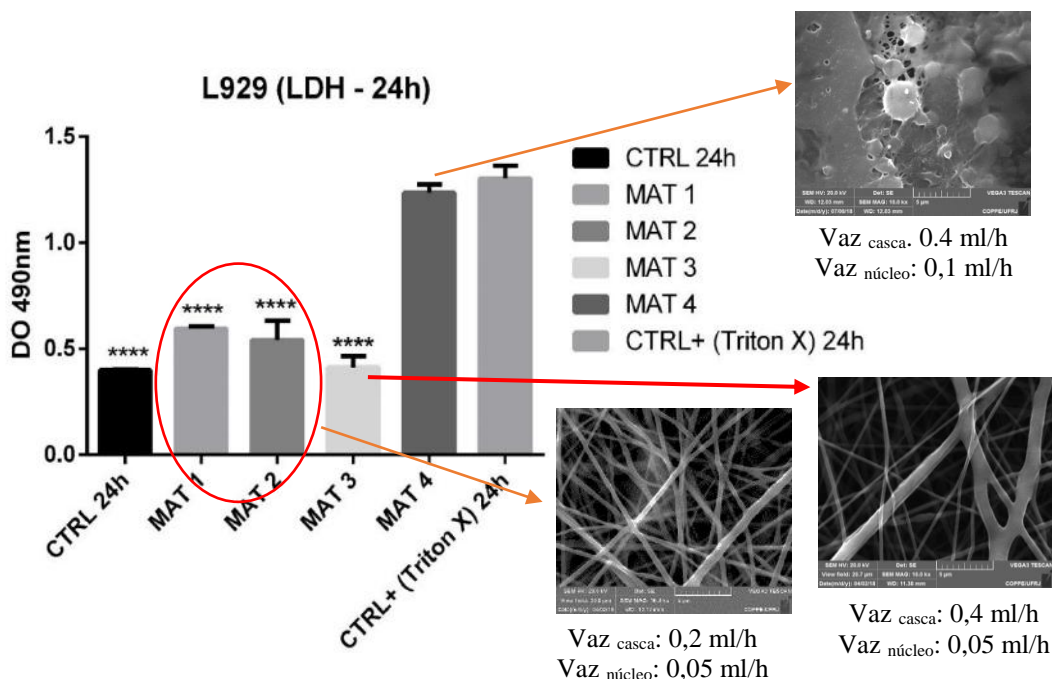
Como o PVA é um polímero hidrossolúvel, a diferença entre as massas de colágeno calculada e teórica de 1,3 mg pode ser atribuída as moléculas de PVA que foram liberadas em solução.

### 5.3.10 Análise de citotoxicidade

Para avaliar se os filmes produzidos apresentam toxicidade para o crescimento das células do tecido (morte, alterações na permeabilidade da membrana celular, etc), foi realizada a análise de citotoxicidade (Figura 44 e 45). Com o objetivo de avaliar a influência das vazões na formação coaxial foram desenvolvidas e foram preparadas 4

amostras variando a vazão da solução de 4% Col\_1/PVA para cada uma delas, sendo: 0,2(MAT3); 0,3(MAT2); 0,5(MAT1) e 1,0 mL/h (MAT4).

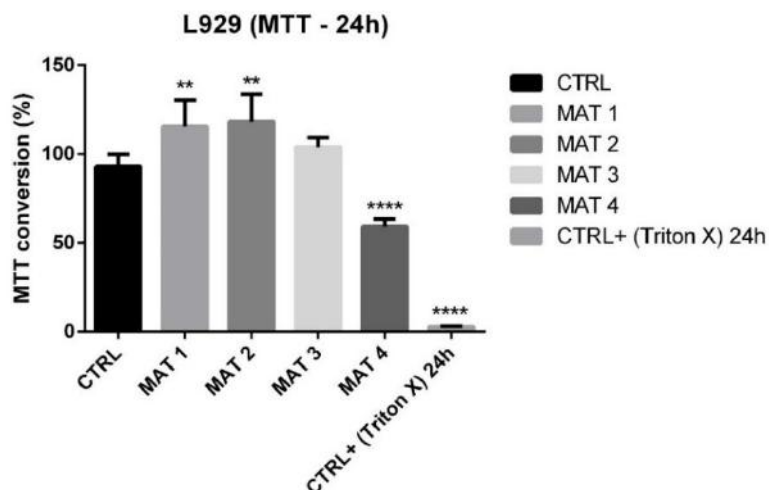
Para avaliar a citotoxicidade das amostras foi realizado ensaios colorimétricos usando dois diferentes testes: o MTT e o LDH (lactato desidrogenase) baseados na absorção óptica. Procurando analisar a diminuição da função celular, medindo produtos das enzimas específicas que determinam atividades vitais.



**Figura 44.** Analise de citotoxicidade DHL *in vitro* de fibras coaxiais com variação da vazão da casca.

Como é mostrado na Figura 44, as amostras com as menores vazões apresentaram condições satisfatórias de crescimento celular, gerando menores níveis de citotoxicidade comparadas com a amostra padrão atóxica (CTRL + Triton X). Porém, a amostra MAT4, apresentou alto nível de inibição ao crescimento celular, gerando condições tóxicas para as mesmas, isto pode ser atribuído à presença de solventes ácidos usados no processo de eletrofiação para esta amostra, o que poderia ser corroborado por MEV, pois esta amostra apresentou fibras fundidas, com regiões compactas (fibras juntas e coalescidas).





**Figura 45.** Análise de citotoxicidade MTT *in vitro* das fibras coaxiais com variação da vazão da casca.

Também foi feito ensaio *in vitro* de MTT (Figura 45), com objetivo de avaliar a atividade enzimática mitocondrial. Foi observado na Figura 46 que as amostras com as melhores condições de eletrofiação coaxial escolhidos neste trabalho (MAT 1 e MAT2) apresentaram maior presença de atividade celular o que mostra que ditas células conseguiram proliferar em maior e melhor quantidade que a mostra padrão usada como controle após de 24 horas de análise, demonstrando a viabilidade destes filmes para serem usados no processo de regeneração da pele, no entanto a Amostra na qual foram duplicadas as vazões (MAT 4) mostrou menor atividade mitocondrial atribuída ao rompimento desta o que demonstra o aumento da morte celular referenciando maior toxicidade que as três mostras anteriores concordando com os resultados registrados no teste de LDH (GALDINO *et al.* 2014).

## CAPITULO VI

### 6 Conclusões

- Investigou-se a influência da concentração do sistema de solvente no processo de eletrofiação monolítica de PCL.
- Constatou-se que a massa molar, a viscosidade e a condutividade elétrica dos solventes possuem influência direta na morfologia das fibras. Foi possível obter fibras de diâmetros homogêneos utilizando o sistema de solventes 70DCM/DMF, que apesar de diminuir a massa molar do polímero durante a eletrofiação, gerou a melhor condição para a fiação do PCL.
- Apesar de ser utilizado por alguns autores como solvente para eletrofiação de PCL, o uso de ácido acético como componente do sistema de solventes, diminuiu a viscosidade da solução e a massa molar do polímero após o processo de eletrofiação, produzindo fibras finas com presença de micro contas. A cristalinidade das fibras eletrofiadas variou para os diferentes sistemas de solventes usados, devido à diminuição da massa molar, que permite diferentes rearranjos das cadeias em cristalitos de diferentes graus de perfeição.
- O Sistema 90AC/AF produziu fibras com a menor cristalinidade. O uso do ácido acético como solvente do PCL degrada o polímero durante a eletrofiação. A concentração usada neste trabalho não atingiu os valores necessários para a formação das fibras contínuas, homogêneas e livres de contas para os sistemas de

solvente contendo AC (90AC/AF, 70AC/AF e 70CLO/AC), que foi atribuído a um excesso de cargas na solução, devido ao caráter ácido do solvente.

- Foi conseguida a eletrofiação do colágeno tipo I com ajuda da PVA usando 4% de PVA e colágeno (4% Col\_1/PVA) com uma relação volumétrica dos solventes 1:1. O PVA foi usado como suporte de fiação para a obtenção das fibras com diâmetros na escala nanométrica e uniformidade relevante sem a presença de defeitos muito grosseiros.
- Com as condições utilizadas, em torno de 40% da estrutura de tripla hélice foi mantida após a eletrofiação monolítica do colágeno.
- Foi possível a obtenção de fibras núcleo – casca a partir de solução de Col\_1/PVA para formação da casca e de solução de PCL para o núcleo. Diferentes valores para vazão, voltagem e distância percorrida foram testadas. Os valores eficazes para a formação do cone de Taylor foram encontrados usando uma relação de 3:4 entre a vazão da casca e a vazão do núcleo gerou, além de estabilidade, largura eficiente para a formação de jatos concêntricos que produziram as fibras coaxiais.
- Foi comprovado por diferentes técnicas que as fibras coaxiais produzidas apresentavam um recobrimento composto por a solução de Col\_1/PVA.
- Os filmes compostos pelas nanofibras coaxiais atingiram grau de intumescimento no equilíbrio de 1850% após 160 horas de imersão em soro fisiológico. Estes resultados demonstraram a capacidade dos filmes de absorção dos exudados expelidos pela ferida sem perder sua integridade física.
- Após 29 dias de imersão dos filmes compostos pelas nanofibras coaxiais foi verificada a perda de aproximadamente 78% de massa, sendo atribuída à liberação das moléculas de colágeno no meio e à degradação das moléculas de PVA. Ensaios in vitro mostraram que o filme não apresentou citotoxicidade.
- Ensaios in vitro de MTT e LDH (lactato desidrogenase) mostraram que a vazão da solução formadora da casca influenciou a citotoxicidade dos filmes devido à taxa de evaporação do solvente.

- Os resultados indicaram que filmes compostos por nanofibras núcleo – casca de PCL – Col\_1/PVA possuem potencial para serem utilizados como curativos de lesões da pele.

## CAPITULO VII

### 7 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo presente que a produção de fibras eletrofiadas tem ampliado suas aplicações, incursionando na engenharia tecidual devido à formação de filmes nano estruturados com alta área superficial, oferecendo melhoras na área de contato com os tecidos se propõem como sugestões para próximos trabalhos como melhoras na aplicabilidade como curativo para pele:

1. Estudar o aumento da concentração do PCL usando como sistema de solvente ácido acético e ácido fórmico (9:1), avaliando o diâmetro das fibras fiadas;
2. Realizar eletrofiação do PCL usando clorofórmio puro como solvente com o objetivo de avaliar a influência do ácido acético no processo de eletrofiação;
3. Realizar estudo de eletrofiação do colágeno I utilizando um colágeno solubilizado, com o objetivo de diminuir a hidrolise da estrutura triple hélice característica do colágeno;
4. Avaliar propriedades mecânicas dos filmes eletrofiados como resistência a tração para as fibras monolíticas de PCL, Col\_1/PVA e as fibras núcleo – casca;
5. Realizar estudo com incorporação de fármacos propondo cinéticas de liberação usando estas estruturas fibrilares de Núcleo – casca;

6. Realizar ensaio *in vitro* e *in vivo* das fibras produzidas em esta pesquisa, avaliando a resposta na compatibilidade e citotoxicidade das fibras em contato com células vivas da pele.
7. Realizar o planejamento de experimentos com o objetivo de avaliar o efeito da interação entre as variáveis e obter as condições de processo otimizadas.

## CAPÍTULO VIII

### 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, L. KIERSZENBAUM. “Histologia e Biologia celular, uma introdução à patologia”. 3ª edição. *Elsevier*, 2012.

ASRAN, A. SH., HENNING, S. and MICHLER, G. H. “Polyvinyl alcohol – collagen – hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level”, *Polymer*, v. 51, pp. 868 – 876, 2010.

BAEK, J., CHEN, X., SOVANI, S., *et al.*, “Meniscus Tissue Engineering Using a Novel Combination of Electrospun Scaffolds and Human Meniscus Cells Embedded Within an Extracellular Matrix Hydrogel”, *JOURNAL OF ORTHOPEDIC RESEARCH MONTH*, 33(4): pp. 572-83, 2015.

BARAKAT, N. A. M., KANJWAL, M. A., SHEIKH, F. A., *et al.*, “Spider-net within the N6, PVA and PU electrospun nanofiber mats using salt addition: Novel strategy in the electrospinning process”, *Polymer*, v. 50(18), pp. 4389-4396, 2009.

BEAR, M. F., CONNORS, B. W., e PARADISO, M. A. Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre 2ª de, Artmed Editora, 2002.

BHARDWAJ, N., KUNDU, S. C. “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique”, *Biotechnology Advances*, v. 28(3): pp. 325-47, 2010.

BOCCACCINI, A. R.; BLAKER, J. J. “Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds”. *Expert Rev. Med. Devices*. v. 2(3): pp. 303-17, 2005.

CERBINO, P. P. “Correlação entre parâmetros do processo de eletrofiação e características de fibras ultrafinas da mistura poliestireno sulfonado/poli(álcool vinílico)”. 2013.

CHAN, B.P.; LEONG, K.W. “Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations”. *Eur. Spine J.* v. 17(Suppl 4), pp. 467–479, 2008.

CIPITRIA, A., SKELTON, A., DARGAVILLE, T. R., *et al.*, “Design, fabrication and characterization of PCL electrospun”, *Journal of Materials Chemistry*. v. 21, pp. 9419-9453, 2011.

CLARK, R. A. F., GHOSH K., TONNESEN M. G. “Tissue Engineering for Cutaneous Wounds”, *Journal of Investigative Dermatology*. v. 127 (5): pp. 1018-29, 2007.

DA SILVA, T. N. “Arcabouços eletrofiados do tipo core-shell PVA/PLA contendo BMP–2 para regeneração periodontal”, 2017.

DA SILVA, M. A. C., OLIVEIRA, R. N., MENDOÇA, R. H., *et al.*, “evaluation of metronidazole – loaded poly(3-hydroxybutirate) membranes to potential application in periodontist treatment”, *Journal of Biomedical materials Research. Part B: applied Biomaterials*, v.104, pp. 106 -115, 2016.

DIAS, J., BARTOLO, P. “Morphological characteristics of electrospun PCL meshes – the influence of solvent type and concentration”. *Procedia CIRP*, v. 5, 216 – 222, 2013.

DIPPOLD, D., CAI, A., HARDT, M., *et al.*, “Novel approach towards aligned PCL-Collagen nanofibrous constructs from a benign solvent system”, *Materials Science & Engineering C*, 2017.

DULNIK, J., DENIS P., SAJKIEWICZ, P., *et al.*, “Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system”, *Polymer Degradation and Stability*, v. 130, pp. 10-21, 2016.

DUQUE, L. M., RODRIGUEZ, L., LÓPEZ, M. “Electrospinning: La era de las nano fibras”, *Rev. Iber. Polímeros*, v. 14, pp. 10-27, 2013.

El tacto: <[http://www.proyectosalonthogar.com/diversos\\_temas/El%20Tacto.htm](http://www.proyectosalonthogar.com/diversos_temas/El%20Tacto.htm)>  
Acesso em: [4 de maio de 2017].

ELAHI, F., LU, W., GUOPING, G. et al., “Core-shell Fibers for Biomedical Applications – A Review”. *J Bioengineer & Biomedical Sci*, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2013.

ELAMPARITHI, A., PUNNOOSE, A. M. e KURUVILLA, S. “Electrospun type 1 collagen matrices preserving native ultrastructure using benign binary solvent for cardiac tissue engineering”, *Informa Healthcare USA, Inc.* pp. 1-8, 2015.

ELZEIN, T., NASSER, M. E., DELAITE, C., BISTAC, S., *et al.*, “FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces”, *Journal of colloid and interface Science*, v. 273, pp. 381 – 387, 2004.

ENIS, I. Y., VOJTECH, J., SADIKOGLU, T. G. “Alternative solvent systems for polycaprolactone nanowebs via electrospinning”, *Journal of industrial textiles*, v. 0 (0) pp. 1 – 14, 2016.

FERNANDES, P. R., BÁRTOLO, P. J. (eds.), Advances on Modeling in Tissue Engineering, Computational Methods in Applied Sciences 20, *Springer Science Business Media B.V.* 2011.

FRANZ PETER. “Collagen Structure and Mechanics”, *Springer*. Germany. 2008.

GALDINO, A. G. S., OLIVEIRA, E. M., FILIPPIN-MONTEIRO, F. B., *et al.*, “Análise de ensaios in vitro do compósito de 50% HA-50% TiO<sub>2</sub> fabricados pelo método da esponja polimérica”, *Cerâmica*, v. 60, p. 586-593, 2014.

GAMBOA, W., MANTILLA, O., CASTILLO, O. “Producción de micro y nano fibras a partir de La técnica “Electrospinning” para aplicaciones farmacológicas”, *Sociedad Cubana de Bioingeniería*, pp. 212-236, 2007.

GHOSAL, K., THOMAS, S., KALARIKKAL, N., *et al.*, “Collagen coated electrospun polycaprolactone (PCL) with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) from an environmentally benign

solvent: preliminary physico-chemical studies for skin substitute”, *Journal of Polymer Research*, v. 21, pp. 410 – 416, 2014.

GIL-CASTELL, O., BADIA, J.D., STRÖMBERG, E., *et al.*, “Effect of the dissolution time into an acid hydrolytic solvent to taylor electrospun nanofibrous polycaprolactone scaffolds”, *European Polymer Journal*, v. 87, pp. 174–187, 2017.

GOKALP, N., ULKER, C., AVCIBASI G. Y. “Synthesis of Polycaprolactone via Ring Opening Polymerization Catalyzed by Candida Antarctica Lipase B Immobilized onto an Amorphous Silica Support”, *J. Polym. Mater*, v. 33(1), pp. 87-100, 2016.

GONÇALVES, R. P., SILVA, F.F.F., PICCIANI, P. H. S., *et al.*, “Morphology and Thermal Properties of Core-Shell PVA/PLA Ultrafine Fibers Produced by Coaxial Electrospinning”, *Materials Sciences and Applications*, v. 6(2), pp. 189-199, 2015.

GROEBER, F., HOLEITER, M., HAMPEL, M., *et al.*, “Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 63(4-5), pp. 352-66, 2011.

GUARÍN, C. C., QUIROGA, P. S., LANDÍNEZ, N. S.P. “Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. Artículo de Revisión”. *Rev. Fac. Med.* v. 61, 2013.

HARRISON, C. A., MACNEIL, S. “The mechanism of skin graft contraction: an update on current research and potential future therapies”. *Burns*. v. 34, 2008.

HOSSEINKAZEMI, H., BIAZAR, E., BONAKDAR, S., *et al.*, “Modification of PCL Electrospun Nanofibrous Mat with Calendula officinalis Extract for Improved Interaction with Cells”, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. v. 64, pp. 459-464, 2015.

HU, X., LIU, S., ZHOU, G., *et al.*, “Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications”, *Journal of Controlled Release*, v. 185, pp. 12 – 21, 2014.

HUANG, Y-S., KUO, C., HUANG, C., *et al.*, “Novel highly aligned, double-layered, hollow fibrous polycarbonate membranes with a perfectly tightly packed pentagonal pore structure fabricated using the electrospinning process”, *Royal society Chemistry*. V.5, pp. 88857–88865, 2015.



HUANG, Z. X., WU, J. W., WONG, S. C., *et al.*, “The Technique of Electrospinning for Manufacturing Core-Shell Nanofibers”, *Materials and Manufacturing Processes*, 2017.

ISAAC, C., LADEIRA, P. R. S., REGO, F. M. P., *et al.*, “Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica”. *Rev Med.* v. 89, 2010.

JHA, B. S., AYRES, C. E., BOWMAN, J. R., *et al.*, “Electrospun Collagen: A Tissue Engineering Scaffold with Unique Functional Properties in a Wide Variety of Applications”, *Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials*. V.1, pp. 1-15, 2011.

JIANG, T., CARBONE E. J., LO, K.W. H., *et al.*, “Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration”, *Progress in Polymer Science*. v. 46, pp. 1-24, 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica: texto e atlas. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 354, 2013.

KALWAR, K., SUN, W. X., LI, D. L., *et al.*, “Coaxial electrospinning of polycaprolactone – chitosan: Characterization and silver nanoparticles incorporation for antibacterial activity”, *Reactive and Functional Polymers*. V. 107, pp. 87–92, 2016.

KHAJAVI, R., e ABBASIPOUR, M. “Electrospinning as a versatile method for fabrication coreshell, hollow and porous nanofibers”. *SCIENTIFICA IRANICA*, v. 19(6), pp. 2029 – 2034, 2012.

KUMAR, M. R. AND FREUND, M. S. “Electrically conducting collagen and collagen–mineral composites for current stimulation”, *RSC Advances*, v.71, 2015.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails, *Medicine*, v. 41(6), pp. 317-320, 2013.

LEVITT, A. S., VALLETT, R., DION, G., *et al.*, “Effect of electrospinning processing variables on polyacrylonitrile nanoyarns”, *J. APPL. POLYM. SCI.* v, 2018.

LI, W. J., MAUCK, R. L., COOPER, J. A., *et al.*, “Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering”, *Journal of Biomechanics*. v. 40, pp. 1686–1693, 2007.

LI, X., YAN, S., DAI, J., *et al.*, “Human lung epithelial cells A549 epithelial – mesenchymal transition induced by PVA/Collagen nanofiber”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017.

LIN, H. Y., KUO, Y. J., CHANG, S. H., *et al.*, “Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potential skin substitutes”, *Biomed. Mater.*, v. 8, pp. 1 – 9, 2013.

LIVERANI, L. and BOCCACCINI, A. R. “Versatile Production of Poly(Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents”, *Nanomaterials (Basel)*, v. 6(4), 2016.

LOSCERTALES, I. G., BARRERO, A., GUERRERO, I., *et al.*, “Micro/Nano Encapsulation via Electrified Coaxial Liquid Jets”, *Science*, v. 295(5560), pp.1695-8, 2002.

LU, T., LI, Y., CHEN, T. “Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering”, *International Journal of Nanomedicine*. v.8, pp. 337-350, 2013.

MACNEIL, SHEILA. “Progress and opportunities for tissue-engineered skin. Review”, *Nature*. v. 445(7130), pp. 874-80. 2007.

MELKONIAN, E. T., READI, A. V., OPAZO, P. S., *et al.*, “Resultados a corto y largo plazo con la técnica de Karydakis para la enfermedad pilonidal sacrocoxígea”, *Rev. Chilena de Cirugía*. v. 65, 2013.

MICHAEL, S., SORG, H., PECK, C. T., *et al.*, “Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser-Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice”, *PLoS ONE*, v. 8(3), 57741, 2013.

MILLAN, M. E. “Preparación de soportes biomateriales con estructuras fibrilares obtenidas mediante electro-hilatura”, 2016.

MOHAMMAD, M., ABDOLRAHMAM, O. A., MOHAMMAD, R., *et al.*, “Incorporation of zeolite and silica nanoparticles into electrospun PVA/collagen nanofibrous scaffolds: The influence on the physical, chemical properties and cell

behavior”, *International journal of polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, v. 65(9), pp. 457 – 465, 2016.

MONTINI, B. F., CALVO, D., CARACCILO, P. C., *et al.*, “Research Paper: Mechanical behavior of bilayered small-diameter nanofibrous structures as biomimetic vascular grafts”, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v. 60, pp. 220-233, 2016.

MORRIS, A. H., STAMER, D. K., KYRIAKIDES, T. R. “Seminars in Immunology: The host response to naturally – Derived extracellular matrix biomaterials”, *Seminars in Immunology*, v. 29, 72-91, 2017.

NAEIMIRAD, M., ZADHOUSH, A., KOTEK, R., *et al.*, “Recent advances in core/shell bicomponent fibers and nanofibers: A review”, *J. APPL. POLYM. SCI*, pp. 46265 – 46265, 2018.

National Institute Biomedical Imaging and Bioengineering:  
<<https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/ingenier%C3%ADa-de-tejidos-y-medicina-regenerativa-0>>. Acessado em: [13 de Abril de 2017].

NISTA, S., PERES, L., D’ÁVILA, M., *et al.*, “Nanostructured Membranes Based on Cellulose Acetate Obtained by Electrospinning, Part 1: Study of the Best Solvents and Conditions by Design of Experiments”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 126, 2012.

NOROUZI, M., BOROUJENI, S. M., OMIDVARKORDSHOULI, N., *et al.*, “Advances in Skin Regeneration: Application of Electrospun Scaffolds”, *Adv Healthc Mater*, v. 4(8), pp. 1114 – 33, 2015.

OLIVEIRA, R. N., ROUZÉ, R., QUILTY, B., *et al.*, “Mechanical properties and *in vitro* characterization of polyvinyl alcohol-nano-silver hydrogel wound dressings”. *Interface FOCUS*, v. 4, pp. 1 – 11, 2014.

OSPINA, V. E., MANTILLA, J. C., CONDE, C. A., *et al.*, “Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea”. *Rev Cienc Salud*. v. 12, 2014.

PHAM, C.; GREENWOOD, J.; CLELAND, H.; *et al.*, “Bioengineered skin substitutes for the management of burns: A systematic review”, *Burns J. Int. Soc. Burn Inj*, v. 33(8), pp. 946-57, 2007.

PRICE, R., ANTHONY, E., MYERS, S., *et al.*, “Tissue engineering for skin transplantation”. *Tissue Engineering. Academic Press*. 2008.

POWELL, H. M., BOYCE, S. T. “Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties. *Tissue Eng Part A*, v.15, 2009.

PUNNOOSE, A. M., ELAMPARITHI, A., e KURUVILLA, S. “Electrospun Type 1 Collagen matrices using a novel benign solvent for Cardiac tissue engineering”, *Journal of Cellular Physiology*, 2015.

RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W., LIM, T., MA, Z. “An introduction to electrospinning and nanofibers”, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore. 2005.

REZAEI, B., GHANI, M., ASKARI, M., *et al.*, “Fabrication of Thermal Intelligent Core/Shell Nanofibers by the Solution Coaxial Electrospinning Process”, *Advances in Polymer Technology*, Vol. 35, 2016.

RICE, J. J., MARTINO, M. M., DE LA PORTE, L., *et al.*, “Engineering the Regenerative Microenvironment with Biomaterials”. *Advanced healthcare materials*. v. 2, 2012.

RUTLEDGE, G. C., FRIDRIKH, S. V. “Formation of fibers by electrospinning”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, 2007.

SAMOUILLAN, V., DELAUNAY, F., DANDURAND, J., *et al.*, “The Use of Thermal Techniques for the Characterization and Selection of Natural Biomaterials”, *J. Funct. Biomater*, v. 2(3), pp. 230-248, 2011.

SALEM, Z. C., PÉREZ, P. J. A., HENNING, L. E., *et al.*, “Heridas. Conceptos generales: Artículo docente”. *Cuad. Cir*. v.14, 2000.

SHAMIM, Z., SAEED, B., AMIR, T., *et al.*, “The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber”, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, v. 7, pp. 42-49, 2012.

SUN, B., LONG, Y.Z., ZHANG, H.D., *et al.*, “Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning”, *Prog. Polym. Sci.*, v.5, pp. 862– 890, 2014.

TARUN, K. GOBI, N. “Calcium alginate/PVA blended nanofiber matrix for wound dressing”, *Indian J. Fiber Text*, v. 36, 2012.

TIMOTHY, J., KEANE, B.S., STEPHEN F., *et al.*, “Pediatric Surgery: Biomaterials for tissue engineering applications”, *Seminars in Pediatric Surgery*, v. 23, 2014.

TONG, H. W., ZHANG, X., WANG, M. “A new nanofiber fabrication technique based on coaxial electrospinning”, *Materials Letters*, V. 66, 2012.

VAN DER SCHUEREN, L., SCHOENMAKER, B., KALAOGLU, Ö. I., *et al.*, “An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone”, *European Polymer Journal*, v. 47, pp. 1256–1263, 2011.

VELNAR, T., BALEY, T., SMRKOLJ, V. “The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms”, *J Int Med Res.* v. 37, 2009.

VELLAYAPPAN, M. V., VENUGOPAL, J. R., RAMAKRISHNA, S., *et al.*, “Electrospinning applications from diagnosis to treatment of diabetes”. *Royal Society of Chemistry*, v. 6(87), p. 83638–83655, 2016.

WOLWACZ, A., CÉSAR, E. O., CIUFO, M. R., *et al.*, “Opções terapêuticas nas cicatrizes queloidianas”. *Rev Soc Bras Cir Plast.* v. 15, 2000.

XIONG, Y., MAYERS, B. T., and XIA, Y. “Some recent developments in the chemical synthesis of inorganic nanotubes”, *Chemical communications*, v. 40, 2005.

XUESHI, L., ZHENZHAO, G., PING, H., *et al.*, “Study on structure, mechanical property and cell cytocompatibility of electrospun collagen nanofibers crosslinked by common agents”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v.113, pp. 476-486, 2018.

YU, W., MA, Q., LI, X., et al., “One-pot coaxial electrospinning fabrication and properties of magnetic-luminescent bifunctional flexible hollow nanofibers”. *Materials Letters*, v. 120, pp. 126-129, 2014.

ZEUGOLIS, D. I., KHEW, S. T., YEW, E. S.Y., *et al.*, “Electro-spinning of pure collagen nano-fibres – Just an expensive way to make gelatin. *Biomaterials*. v. 28, 2008.

ZHANG, X., XU, L., HUANG, X., *et al.*, “Structural study and preliminary biological evaluation on the collagen hydrogel crosslinked by  $\gamma$ -irradiation”, *J Biomed Mater Res Part A*, pp. 1-10, 2012.

ZHANG, W., ZHU, Y., LI, J., *et al.*, “Cell-Derived Extracellular Matrix: Basic Characteristics and Current Applications in Orthopedic Tissue Engineering”. *TISSUE ENGINEERING*. v. 22, 2016.

ZHANG, X., TANG, K. and ZHENG, X. “Electrospinning and Crosslinking of COL/PVA Nanofiber-microsphere Containing Salicylic Acid for Drug Delivery”, *Journal of Bionic Engineering*, v. 13(1). pp. 143-149, 2016.

ZANG, Y. Z., VENUGOPAL, J., HUANG, Z. M., *et al.*, “Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun PCL-Collagen Nanofibers Using Fibroblasts”, *Biomacromolecules*, v.6, pp. 2583 – 2589, 2005.

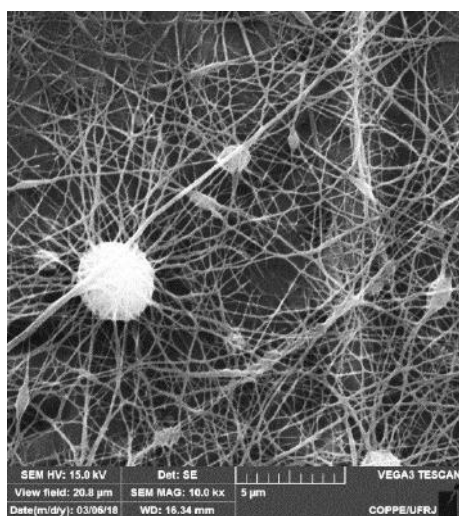
ZHAO, P., JIANG, H., PAN, H., et al., “Biodegradable fibrous scaffolds composed of gelatin coated poly( $\epsilon$ -caprolactone) prepared by coaxial electrospinning”. *Society of Biomaterials*. v. 83A, 2007.

ZHU, M., HAN, J., WANG, F., et al., “Electrospun Nanofibers Membranes for Effective Air Filtration. *Macromol*”, *Mater. Eng*, v. (2017).

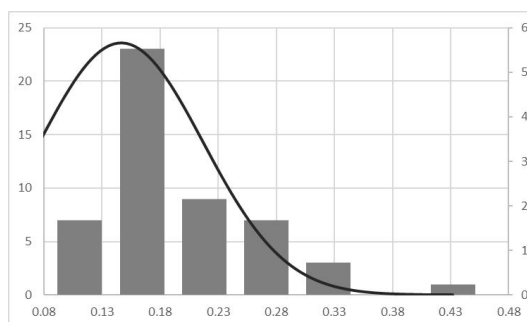
## CAPÍTULO IX

### 9 ANEXOS: HISTOGRAMAS

1. AMOSTRA COAXIAL: Col\_1/PVA – PCL, com vazão externa de 0,02 ml/h; 17 KV; 10 cm.

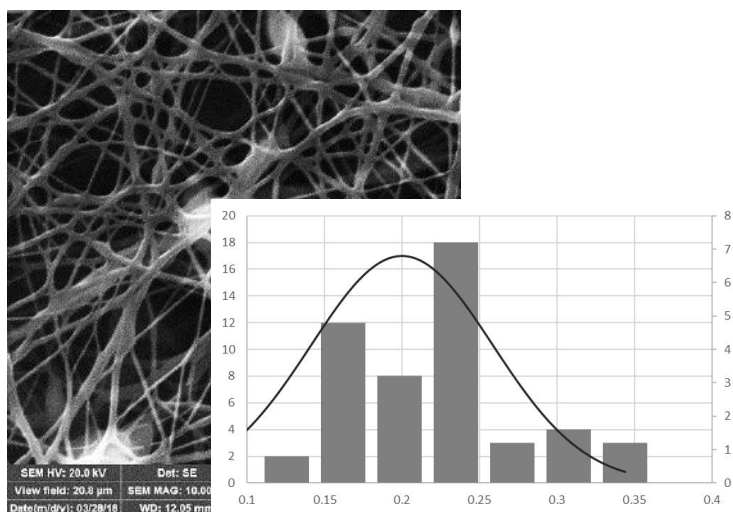


Diâmetro	167,7 nm
Desvio	$\pm 70,4$ nm

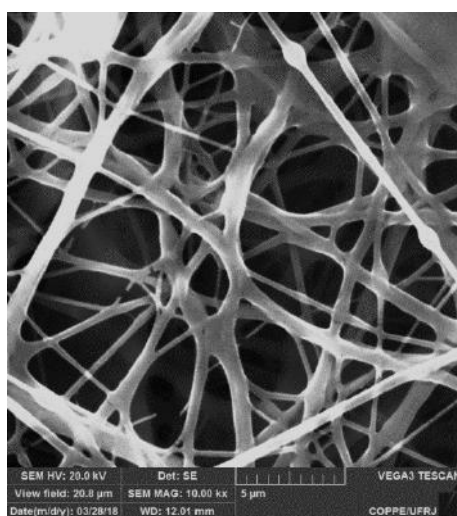


2. Fibras núcleo – casca usando vazão interna de 0,05 ml/h

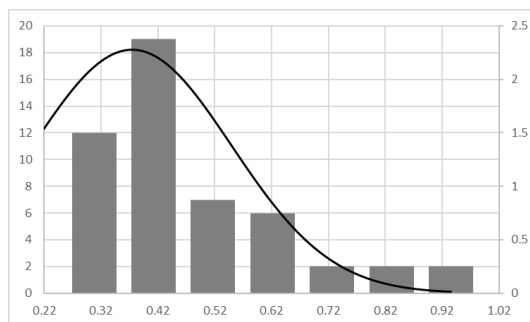
Diâmetro	278,5 nm
Desvio	$\pm 98,2$ nm



3. Fibras núcleo – casca, usando vazão interna de 0,06 ml/h



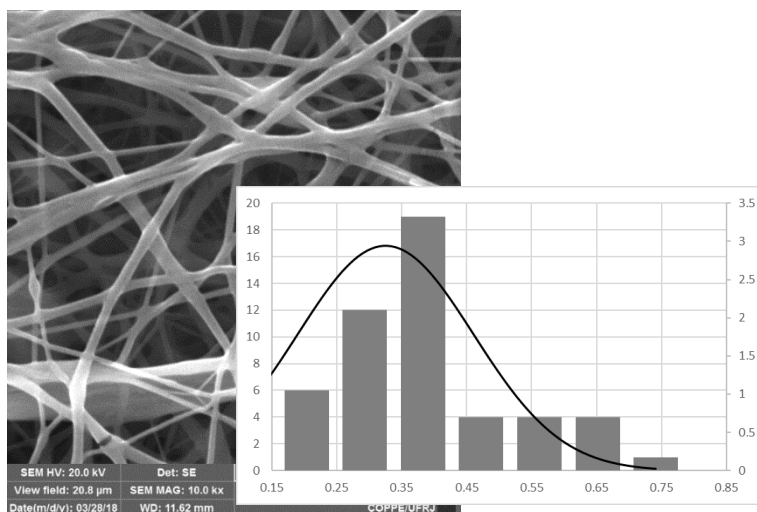
Diâmetro	430 nm
Desvio	± 321 nm



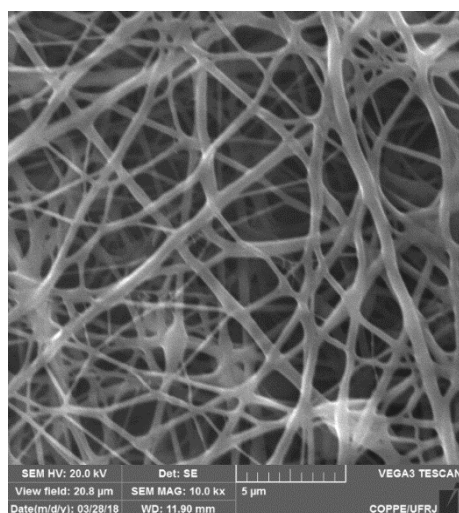
4. Fibras núcleo – casca: 15 kV, 10 cm e vazão PCL: 0,05 ml/h; vazão casca: 0,2 ml/h.

Diâmetro	323,1 nm
Desvio	± 91,6 nm

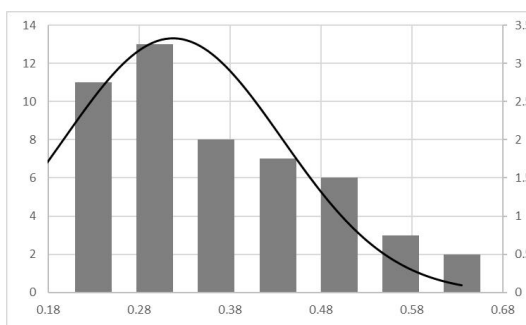




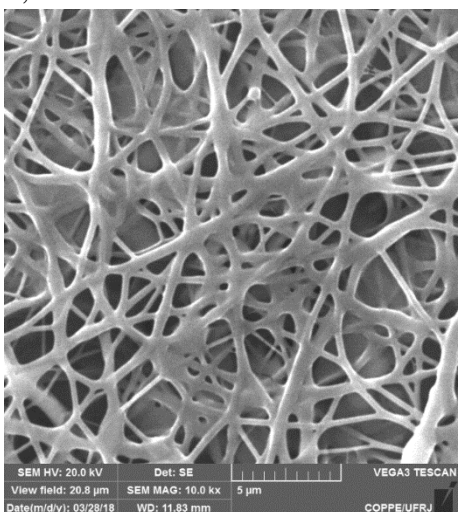
5. Fibras núcleo – casca: com 16 kV, 10 cm e vazão PCL: 0,05 ml/h; vazão casca: 0,2 ml/h.



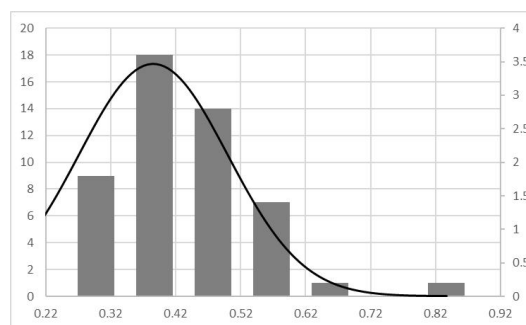
Diâmetro	345,9 nm
Desvio	$\pm 171,4$ nm



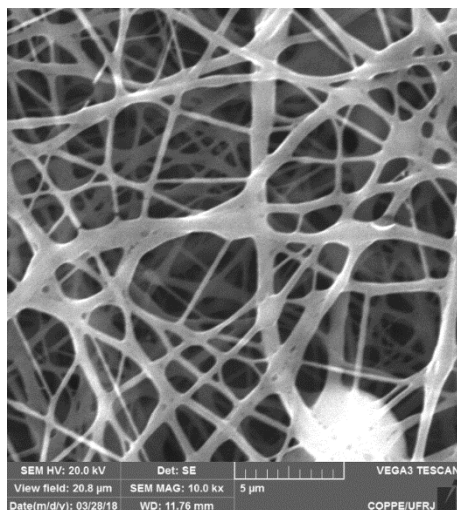
6. Fibras núcleo – casca: com 17 kV, 10 cm e vazão PCL: 0,05 ml/h; vazão casca: 0,2 ml/h.



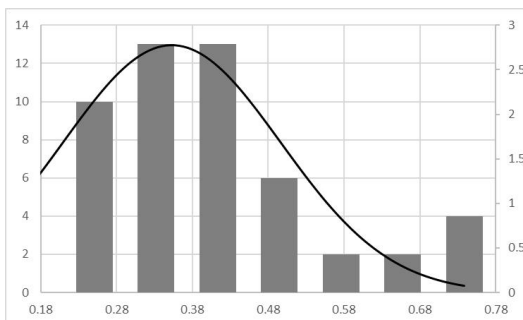
Diâmetro	391 nm
Desvio	$\pm 114,8$ nm



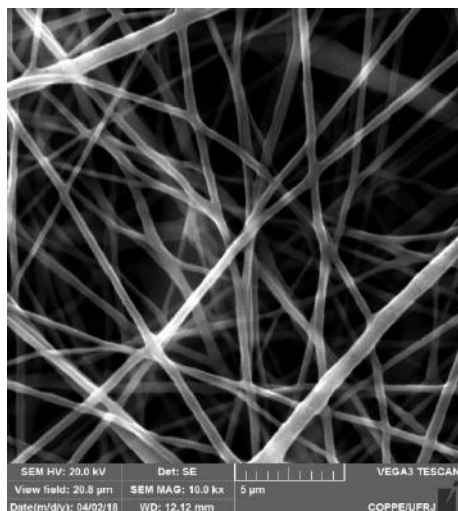
7. Fibras núcleo – casca: com 19 kV, 10 cm e vazão PCL: 0,05 ml/h; vazão casca: 0,2 ml/h.



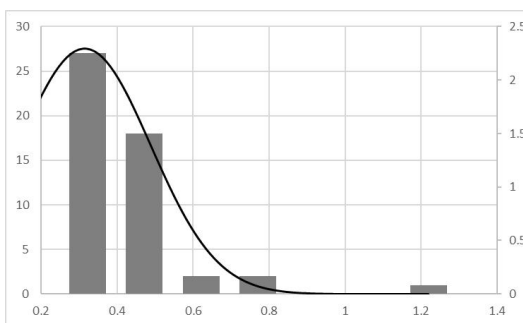
Diâmetro	377,4 nm
Desvio	$\pm 143,8$ nm



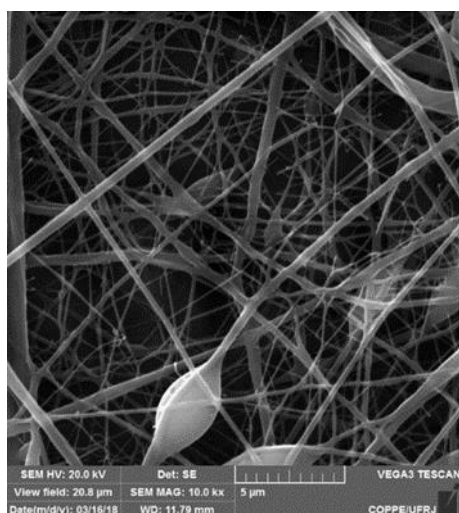
8. Fibras núcleo – casca com 12 cm de distância percorrida (vazão PCL: 0,05 ml/h; vazão casca: 0,2 ml/h; V: 16kV)



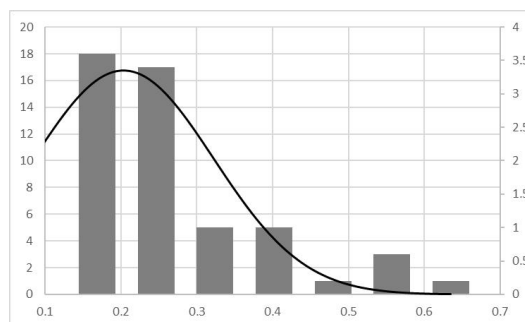
Diâmetro	346,6 nm
Desvio	$\pm 179,3$ nm



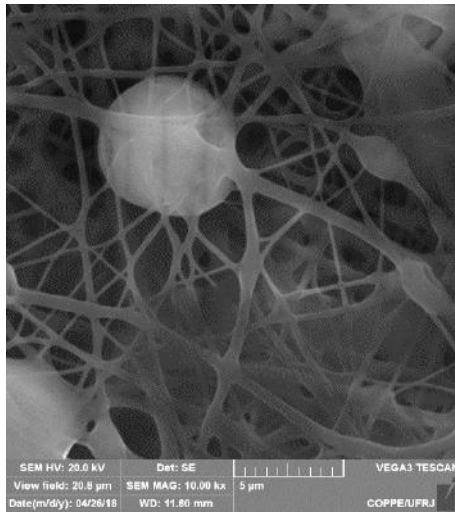
9. Fibras núcleo – casca com 14 cm de distância percorrida (vazão PCL: 0,05 ml/h; vazão casca: 0,2 ml/h; V: 16kV).



Diâmetro	235.5 nm
Desvio	$\pm 118.9$ nm



10. Fibras núcleo – casca com 14 cm de distância percorrida (vazão PCL: 0,05 ml/h; vazão casca: 0,2 ml/h; V: 16kV).



Diâmetro	309.8 nm
Desvio	$\pm 135.7$ nm

